

Untersuchungen von Serumresistenz-Mechanismen an Escherichia coli

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Fakultät für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
BRITTA KUBENS
aus Bochum

Bochum 1987

Untersuchungen von Glycerin-Isotopen
an Echtenesseln

DIPLOM
zur Erlangung des Grades eines
Diploms der Naturwissenschaften
der
Fakultät für Biologie
an der Rhein-Universität Bonn

verlegt von
BRITTA KUBENS
aus Bonn

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.1987

Referent: Prof. Dr. W. Opferkuch

Korreferent: Prof. Dr. R. Berzborn

Bonn 1987

Die vorliegende Arbeit wurde am

Institut für Hygiene und Mikrobiologie
Abteilung Med. Mikrobiologie und Immunologie

unter der Anleitung von Herrn Prof.Dr. W. Opferkuch in
der Zeit von Januar 1983 bis Januar 1987 angefertigt.

Danksagung

Herrn Prof.Dr. W. Opferkuch, meinem wissenschaftlichen Lehrer, danke ich herzlich für seine großzügige Unterstützung und engagierte Förderung dieser Arbeit. Seinem steten Interesse und seiner Bereitschaft zur Diskussion verdanke ich zahlreiche Anregungen im Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof.Dr.Dr.h.c. H. J. Müller-Eberhard, Department of Immunology, Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, California, gilt mein besonderer Dank für fruchtbare Gespräche und für seine großzügige Bereitschaft, einen Teil dieser Arbeit in seinem Institut zu ermöglichen.

Herrn Prof.Dr. B. Wiedemann, Institut für Med. Mikrobiologie und Immunologie der Universität Bonn, Abt. Med. Mikrobiologie für Pharmazeuten, und Herrn Prof.Dr. W. Goebel, Institut für Genetik und Mikrobiologie, Universität Würzburg, danke ich für ihre Bereitschaft, einen Teil dieser Arbeit in ihren Instituten durchführen zu dürfen.

Frau B. Andres (Bochum), Frau E. Kessel (Bonn), Frau I. Then (Würzburg) und Frau L. Wood (La Jolla) danke ich für ihr hilfreiches und zuverlässiges Engagement bei der technischen Durchführung einer Reihe von Untersuchungen.

Meinen Kollegen und Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie, Abt. Med. Mikrobiologie und Immunologie in Bochum danke ich herzlich für die Zusammenarbeit und manche Hilfestellung.

Herrn Dr. B. Rowe, London, und Herrn Prof.Dr. M. Achtman Berlin, sei für die bereitwillige Überlassung von K1-spezifischen Phagen bzw. Anti-Meningokokken B-Serum gedankt.

Der Heinrich Hertz-Stiftung, Düsseldorf, bin ich für die finanzielle Unterstützung meines Forschungsaufenthaltes an der Scripps Clinic in Kalifornien zu Dank verpflichtet.

1.	Einleitung	1
1.1.	Der klassische Reaktionsweg	3
1.2.	Der alternative Reaktionsweg	7
1.3.	Der Membran-Angriffs-Komplex	11
1.4.	Einfluß von Faktor H auf die Komplement-aktivierung	18
1.5.	Einfluß des S-Proteins auf den MAC	22
1.6.	Molekulare Grundlagen der Serumresistenz	24
1.7.	Mechanismus der Serumresistenz	28
1.8.	Zielsetzung der Arbeit	33
2.	Material und Methoden	37
2.1.	Material	37
2.1.1.	Stämme	37
2.1.2.	Medien, Puffer und Lösungen	37
2.1.3.	Antiseren	40
2.1.4.	Komplementkomponenten	40
2.1.5.	Chemikalien	40
2.2.	Methoden	41
2.2.1.	Konjugation	41
2.2.2.	Plasmidale DNA-Isolation	41
2.2.3.	Transformation	41
2.2.4.	Chromosomale DNA-Isolation	42
2.2.5.	Filter-Hybridisierung nach Übertragung des Nukleinsäuremusters auf Nitrozellulosefilter mit Hilfe der Southern Blot Technik	42
2.2.6.	Immunelektrophorese	43
2.2.7.	K1-Phagentest	43
2.2.8.	Rocketimmunelektrophorese	43
2.2.9.	Serumresistenztest	44

2.2.10.	Immunfluoreszenztest	44
2.2.11.	Hämolytische Tests zur quantitativen Bestimmung des C3- und C5-Verbrauches	45
2.2.12.	Radioaktive Markierung von Komplementkomponenten	46
2.2.13.	Nachweis der Anlagerung von radioaktiv-markierten Komplementkomponenten an Bakterien	47
2.2.14.	Saccharose-Dichte-Gradienten Zentrifugation des inkubierten Serums	47
2.2.15.	CH ₅₀ und alternativer CH ₅₀	47
2.2.16.	Messung der C4-Aktivität	48
2.2.17.	SDS-Page	48
2.2.18.	Blotting	49
2.2.19.	Entwicklung eines Blots	49
2.2.20.	Ouchterlony	49
2.2.21.	Silberfärbung	49
2.2.22.	Proteingehaltsbestimmung	50
2.2.23.	KDO-Gehalt-Bestimmung	50
2.2.24.	Neuraminsäurenachweis	50
2.2.25.	Berechnungen	50
3.	Ergebnisse	51
3.1.	Untersuchung des Mechanismus der Serumresistenz durch Freisetzung des MAC	51
3.1.1.	Herkunft und Charakterisierung der verwendeten Mutanten	51
3.1.2.	Genetische Experimente mit den Wildtypen und ihren Mutanten	54
3.1.3.	Auftrennung des Protein- und des LPS-Musters der äußeren Membran von Wildtypen und ihren Mutanten im Polyacrylamid-Gel	56
3.1.4.	Definition der Serumresistenz	57
3.1.5.	Serumresistenz der Wildtypen und ihrer Mutanten	59

3.1.6.	Serumresistenz bei unterschiedlichen Serumspezies	59
3.1.7.	Unterschiedliche Ausprägung der Serumresistenz bei Ausschaltung des klassischen Reaktionsweges	61
3.1.8.	Serumresistenz bei Inkubation mit Mangelseren	61
3.1.9.	Anlagerung von radioaktiv-markierten Komplementkomponenten an einen Wildtyp und seine Mutante	63
3.1.10.	Nachweis des abdissoziierten MAC	64
3.1.11.	Untersuchungen des abdissoziierten MAC	66
3.1.11.1.	Auftrennung der einzelnen Komponenten im Acrylamid-Gel	66
3.1.11.2.	Nachweis der Komponente C9 in monomerer und polymerer Form	67
3.1.11.3.	Nachweis des S-Proteins im abdissoziierten MAC	68
3.2.	Untersuchungen unterschiedlicher Mechanismen der Serumresistenz	69
3.2.1.	Charakterisierung der BK-Stämme	69
3.2.2.	Serumresistenz der BK-Stämme	70
3.2.3.	Komplementaktivierung durch die serum-resistenten BK-Stämme	71
3.2.3.1.	Immunfluoreszenztest mit FITC-markiertem anti-C3 Serum	71
3.2.3.2.	Immunfluoreszenztest auf C5-Anlagerung	71
3.2.3.3.	Immunfluoreszenztest mit FITC-markiertem anti-Faktor H Serum	72
3.2.4.	Anlagerung von radioaktiv-markierten Komplementkomponenten an die BK-Stämme	73
3.2.5.	Verbrauch von C3 und C5 in NHS durch Inkubation mit BK-Stämmen	74
3.2.6.	Reaktionsweg der Komplementaktivierung durch die BK-Stämme	77
3.2.7.	Nachweis des abdissoziierten MAC nach Inkubation der BK-Stämme in Serum	79
3.2.8.	Weitere Untersuchungen der verwendeten BK-Stämme	80

3.2.8.1.	Proteinmuster der äußeren Membran der BK-Stämme	80
3.2.8.2.	Bestimmung des Protein- und KDO-Gehaltes der BK-Stämme	82
3.2.8.3.	Neuraminsäuregehalt der verwendeten BK-Stämme	83
4.	Diskussion	85
4.1.	Neue Fakten zu dem bereits bekannten Mechanismus der Serumresistenz	85
4.1.1.	Charakterisierung der Wf-Stämme und ihrer Mutanten	85
4.1.2.	Mögliche Ursachen der Serumresistenz	89
4.1.3.	Serumresistenz der Wildstämme und ihrer Mutanten	92
4.1.4.	Zusammensetzung und Abdissoziation des MAC	96
4.2.	Ein neuer Mechanismus der Serumresistenz	104
4.2.1.	Gruppeneinteilung der BK-Stämme	104
4.2.2.	Komplementbindung und -verbrauch durch die BK-Stämme	106
4.2.3.	Charakterisierung der BK-Stämme unter besonderer Berücksichtigung der Bakterienoberflächen	110
4.2.4.	Mögliche Ursachen des alternativen Mechanismus der Serumresistenz	113
5.	Zusammenfassung	120
6.	Abkürzungen	124
7.	Literaturverzeichnis	125

1. Einleitung

Die abtötende Wirkung des menschlichen und tierischen Serums auf Bakterien verschiedener Spezies ist seit nahezu 100 Jahren bekannt (Nuttall, 1888, Buchner, 1889a,b, Bordet, 1896). Das Komplementsystem ist als derjenige Serumbestandteil identifiziert worden, der dieser humoralen Infektabwehr zugrunde liegt. Es handelt sich dabei um ein aus 20 Plasmaproteinen zusammengesetztes System, von dem 7 Proteine als Regulationsfaktoren zu betrachten sind (Müller-Eberhard, 1986).

Die bakterizide Wirkung des Serums setzt eine Aktivierung des Komplementsystems entweder durch die Wechselwirkung der Komponente C1 mit Antikörpern (=klassischer Reaktionsweg) (Übersichtsartikel Inoue, 1972) oder durch direkte Aktivierung des C3 z.B. durch das Lipopolysaccharid (LPS) der äußeren Bakterienmembran (=alternativer Reaktionsweg) (Götze und Müller-Eberhard, 1971, Jasin, 1972, Root et al., 1972, Fine, 1975, Winkelstein et al., 1976, Bjornson und Bjornson, 1977, Schreiber und Müller-Eberhard, 1978) und die anschließende Bildung eines Membran-Angriffs-Komplexes (MAC) aus den Komponenten C5 bis C9 und dessen Integration in die äußere Bakterienmembran (Kroll et al., 1984) voraus. Zusätzlich zu den beschriebenen Aktivierungswegen besteht auch noch die Möglichkeit der direkten C1-Aktivierung ohne Antikörper (Loos et al., 1974, Cooper und Morrison, 1978, Loos et al., 1978, Betz und Isliker,

1981) und der antikörperabhängigen Aktivierung des alternativen Reaktionsweges (Winkelstein et al., 1972, Winkelstein und Shin, 1974, Siroták et al., 1976, Stephens et al., 1977, Hill et al., 1978, Edwards et al., 1980, Tarr et al., 1982, Joiner et al., 1983c,d, Joiner et al., 1985a). Das Komplementsystem ist aber nicht nur durch die direkte Abtötung von Bakterien für die Infektabwehr von Bedeutung, sondern einzelne Komponenten können in Verbindung mit zellulären Abwehrmechanismen z.B. über die Opsonisierung von Bakterien als Hilfsmittel der Phagozytose wirken.

Einige Bakterienstämme können der bakteriziden Wirkung des Serums entgehen. Diese serum-resistenten Bakterien sind in der Lage schwere Infektionen zu verursachen. Serumresistenz muß also als Virulenzfaktor angesehen werden. Die molekularen Reaktionen der Komplementkomponenten auf der Bakterienoberfläche bilden die Grundlage für den Mechanismus der Serumresistenz. Beide Wege der Komplementaktivierung (klassisch und alternativ) stellen eine sequentiell ablaufende mehrstufige Aktivierungskaskade dar, die zur Bildung der C5 Konvertase führt, welche die Reaktionen der terminalen Komplementkomponenten initiiert. Die beiden Reaktionswege sollen aufgrund ihrer Bedeutung als Vorstufen zur Bildung des eigentlichen Effektormoleküls, des MAC, im Einzelnen dargestellt werden.

1.1. Der klassische Reaktionsweg

Der klassische Reaktionsweg kann durch Antigen-Antikörper Komplexe aktiviert werden. Es sind eine Reihe von antigenen Strukturen der Bakterienoberfläche bekannt, gegen die Antikörper gebildet werden können, so z.B. das Lipopolysaccharid, Proteine der äußeren Membran, die Kapsel oder auch Geißeln.

Die Aktivierung von C1 durch den Antigen-Antikörper Komplex umfaßt verschiedene Schritte (Loos, 1982). C1 ist ein Makromolekül, das sich aus drei Untereinheiten, C1q, C1r und C1s, zusammensetzt (Lepow et al., 1963). Es besteht aus einem Molekül C1q und je zwei Molekülen C1r und C1s, die durch Ca^{++} Ionen verbunden sind ($\text{C1qC1r}_2\text{C1s}_2$) (Ziccardi und Cooper, 1977, Siegel et al., 1981). Antikörper der Immunglobulin-Klassen IgG und IgM besitzen Bindungsstellen für die C1q Untereinheit des C1. Die Bindungsstellen sind in dem Fc-Teil des Antikörper-Moleküls lokalisiert. Am Beispiel der IgM Antikörper soll die Bindung von C1q an den Antikörper dargestellt werden. IgM kann in freier Lösung weder an C1 binden noch es aktivieren. Monomeres IgM hat anscheinend nur eine einzige Bindungsstelle für C1q, weitere Bindungsstellen werden nachweisbar, sobald das IgM an ein Antigen z.B. eine Struktur der Bakterienoberfläche gebunden ist. Borsos und Rapp (1965) können zeigen, daß schon ein einziges Antikörpermolekül auf der Oberfläche eines Schafserythrozyts in der Lage ist ein

C1 Molekül zu binden und zu aktivieren, so daß die Komplementkaskade initiiert wird.

Die Bindung von C1 an ein oder mehrere Antikörpermoleküle und die nachfolgende Aktivierung des klassischen Reaktionsweges der Komplementreaktion müssen als zwei getrennte Prozesse gesehen werden. Die Aktivierung des C1 Moleküls wird durch die Bindung der C1q Untereinheit an einen Aktivator z.B. ein Immunglobulin eingeleitet. Die C1 Bindung bildet offensichtlich die Voraussetzung für die Aktivierung (Cooper, 1985). In dem C1q Molekül kommt es durch die Bindung an ein Immunglobulin zur Freisetzung einer neuen antigenen Determinante, die mit Hilfe von monoklonalen α -C1q Antikörpern nachgewiesen werden konnte (Golan et al., 1982). Das Ergebnis kann als Beweis für eine Konformationsänderung innerhalb des C1q Moleküls gesehen werden. Der Mechanismus, durch den es zur Aktivierung von C1r kommt, ist nicht völlig erforscht. Ziccardi und Cooper (1976b) zeigen, daß die Spaltung der beiden C1r Polypeptidketten in Disulfid-gebundene Untereinheiten für die Aktivierung des C1r erforderlich ist. Das aktivierte C1r ist dann in der Lage auf C1s zu wirken (Ziccardi und Cooper, 1976a,b) und es ebenfalls zu aktivieren.

In diesem Zusammenhang werden zwei mögliche Mechanismen diskutiert. Durch die Bindung von C1q an den Immunkomplex und seine Konformationsänderung (Golan et al., 1982) besteht die Möglichkeit, daß auch im C1r Molekül

eine Veränderung eintritt, die zur Freisetzung eines aktiven Enzyms führt. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, daß sich C1r selbst aktiviert. In diesem Fall muß postuliert werden, daß eine solche Autoaktivierung entweder auch bei C1-Molekülen in freier Lösung sehr langsam stattfindet oder völlig unterbleibt, während bei dem gebundenen C1 die Verhältnisse derart geändert sind, daß die Aktivierung erfolgen kann. Konformationsänderungen, die die erste Theorie stützen würden, beschreibt Golan et al. (1982). Auf der anderen Seite gibt es noch keine Anhaltspunkte für den Einfluß einer solchen Strukturveränderung auf die C1r-C1s Aktivierung. Für die zweite Theorie sprechen die Ergebnisse von Colomb et al. (1982), die zeigen, daß C1r zur Autoaktivierung ohne Kontakt zu anderen Molekülen fähig ist. Gereinigtes C1r liegt in dimerer Form vor. Bei einer Reihe von Molekülen kann eine intradimere Aktivierung beobachtet werden, wobei ein Molekül in der Lage ist das andere zu spalten und das zweite durch die Aktivierung ebenfalls zur Spaltung des ersten befähigt ist.

Eine weitere Hypothese (Goers et al., 1977) fordert neben der C1q Bindung zusätzlich die Bindung des C1r-C1s Tetramers. Bartholomew und Esser (1980) beobachteten direkte C1-Aktivierung ohne Antikörper nur bei gleichzeitiger Bindung der beiden Untereinheiten C1q und C1s an ein Retrovirus. Tenner et al. (1984) beschreiben eine solche Antikörper-unabhängige C1 Aktivierung mit C1q und

C1s Bindung auch für E.coli. Loos (1982) postuliert, daß die Aktivierung von C1 nach dem Binden an den Antigen-Antikörper Komplex durch parallele Aktivierung der beiden Komponenten C1q und C1r erfolgt. Aktiviertes C1r kann dann im letzten Schritt C1s durch enzymatische Spaltung ebenfalls aktivieren. Das aktivierte C1s (C1 Esterase) (Naff und Ratnoff, 1968) ist nun in der Lage C4 und C2 zu spalten und so die Komplementkaskade des klassischen Reaktionsweges mit den nächsten beiden Komponenten fortzuführen.

C4 ist ein aus drei Ketten zusammengesetztes Polypeptid, bei dem durch die Wirkung von aktiviertem C1s ein etwa 6.000 Dalton großes Stück der α -Kette, das C4a, abgespalten wird. An dem größeren Fragment (C4b) wird dadurch eine hochgradig labile Bindungsstelle freigesetzt. Nur wenn bei der Spaltung von C4 ein Akzeptor für C4b vorhanden ist, z.B. auf einem Schafserythrozyt als EAC1, bleibt die Bindungsstelle des C4b erhalten und C4 kann zur Fortführung der Komplementkaskade beitragen. Fehlt ein solcher Akzeptor, so degeneriert die Bindungsstelle auf C4b und die Aktivierung bricht ab.

Am Modell der Hämolyse von Schafserythrozyten soll auch die weitere Aktivierung des klassischen Reaktionsweges aufgezeigt werden. EAC14b besitzt eine Bindungsstelle für C2, das zweite natürliche Substrat der C1 Esterase. Natives C2 kann an EAC14b gebunden werden, diese Anlagerung ist aber abhängig vom Vorhandensein von

Mg⁺⁺ Ionen. Das C2 des entstandenen C4b2 Komplexes wird durch aktiviertes C1s oder andere proteolytische Enzyme in C2a und C2b gespalten. Das größere Fragment C2a bleibt am C4 gebunden und dieser Komplex kann die nächste Komponente (C3) spalten. Der C4b2a Komplex wird daher auch C3 Konvertase des klassischen Reaktionsweges genannt. Die enzymatische Aktivität der C3 Konvertase ist in dem C2a Molekül lokalisiert und spezifisch für C3. Der C4b2a Komplex ist in Abwesenheit einer ausreichenden Konzentration an C3 recht instabil, nach dem Abdissoziieren des C2a Fragmentes in inaktiver Form kann aber neues natives C2 wieder durch das verbleibende C4b aktiviert und so frisches Enzym gebildet werden (Loos, 1985).

C3 ein zweikettiges Glycoprotein kann durch die C3 Konvertase in C3a und C3b gespalten werden. Das größere Fragment C3b bindet an die Konvertase, es wird in unmittelbarer Nähe des Immunglobulins an die Erythrozyten-Oberfläche gelagert und besitzt die Fähigkeit C5 zu binden. Es entsteht der C4b2a3b Komplex, der wiederum durch seine Untereinheit C2a enzymatische Aktivität gegen C5 besitzt, also die C5 Konvertase des klassischen Reaktionsweges darstellt.

1.2. Der alternative Reaktionsweg.

Für die Komplementaktivierung über den alternativen Reaktionsweg werden die Komponenten C1, C2 und C4 des

klassischen Weges nicht benötigt, Faktor B und Faktor D übernehmen ihre Stelle. Die Funktion von C2 wird von Faktor B und einige Funktionen von C1 von Faktor D wahrgenommen. Ein zusätzliches Protein, das für die optimale Aktivierung erforderlich ist, das Properdin, besitzt kein Analogon im klassischen Reaktionsweg. Im Gegensatz zum klassischen Weg, der wegen der Beteiligung von C1 kalziumabhängig ist und erst nach der Bildung der C3 Konvertase nicht mehr von dem Kalziumchelator EGTA blockiert werden kann, benötigt der alternative Reaktionsweg Magnesium-Ionen für die Reaktion des C3 mit Faktor B (Lachmann und Hughes-Jones, 1984).

Der alternative Reaktionsweg beginnt mit der enzymatischen Spaltung von C3 im Serum und der Entstehung von C3b. Lachmann (1979) postuliert, daß C3b in geringer Konzentration im Serum spontan gebildet wird, während Fearon und Austen (1975a) die Meinung vertreten, daß natives C3 mit Faktor B und D und eventuell auch Properdin eine Konvertase bildet, die das initiale C3b erzeugt. Andere Untersuchungen (Pangburn und Müller-Eberhard, 1980, 1981) stützen die Hypothese, daß eine bisher nicht bekannte Form des C3 im Serum, die sich von nativem C3 unterscheidet, die C3 Untereinheit des initialen Enzymes darstellt.

Die C3 Konvertase, die mit diesem andersartigen C3 Molekül gebildet wird, erzeugt durch proteolytische Spaltung ein C3b Molekül, das in der Lage ist sich an

Oberflächen bestimmter biologischer Partikel zu binden. Eine Reihe von Oberflächenstrukturen der Bakterien können C3b binden, sind also Aktivatoren des alternativen Reaktionsweges. Besondere Bedeutung kommt dabei dem LPS (Pillemer et al., 1955) zu, dessen Polysaccharid-Seitenketten mit dem C3b reagieren und damit die weiteren Stufen der Komplementkaskade aktivieren (Morrison und Kline, 1977). LPS kann aber nicht nur als Aktivator allgemein angesehen werden, sondern es kommt ihm auch eine Schutzfunktion zu. Pangburn et al. (1980) konnten zeigen, daß die Affinität von C3b zu Faktor B größer als zu Faktor H ist, wenn das C3b an E.coli-LPS gebunden ist. Das derart gebundene C3b ist also eher in der Lage weiteres C3b zu aktivieren als durch Faktor H und Faktor I inaktiviert zu werden. Auf die besondere Funktion von Faktor H soll in einem späteren Abschnitt näher eingegangen werden.

Neben den kurzen und langen Polysaccharid-Seitenketten des LPS (Grossmann und Leive, 1984) können auch Proteine der äußeren Membran (Joiner et al., 1984a) und die Kapsel des E.coli Stammes O111B4 als Aktivatoren identifiziert werden.

Das gebundene C3b unterliegt zwei konkurrierenden Prozessen: Amplifikation und Inaktivierung. Bei der Amplifikation bindet ein Molekül des Faktors B an ein C3b Molekül und wird dort durch Faktor D, der stets in aktiver Form im Serum vorliegt (Lesavre und Müller-

Eberhard, 1978), in Ba und Bb gespalten. Es entsteht auf dem Aktivator ein C3bBb Komplex, der eine C3 Konvertase darstellt, also in der Lage ist, weitere C3 Moleküle zu C3b zu spalten. Jedes neu entstandene C3b Molekül besitzt die gleiche Fähigkeit, so daß es zu einer positiven Rückkoppelung kommt (Müller-Eberhard und Götze, 1972). Die zusätzlichen, neu entstandenen C3b Moleküle lagern sich in der Nähe des ersten C3b Moleküls auf der Aktivatoroberfläche an. Ein Molekül C3b und ein Molekül Faktor B bilden in Anwesenheit von Mg^{++} den stabilen bimolekularen Komplex C3b,B, der keine enzymatische Aktivität besitzt (Nicholson et al., 1975, Medicus et al., 1976a, Vogt et al., 1977, Lesavre und Müller-Eberhard, 1978).

Durch die Vielzahl von gebundenen C3b Molekülen um jeden Enzymkomplex bildet sich aus der C3 Konvertase die C5 Konvertase (C3bBbC3b) (Daha et al., 1976, Medicus et al., 1976a). Das zusätzliche C3b Molekül wird zur Modulation des C5 Moleküls für die enzymatische Spaltung benötigt (Hammer et al., 1976, Vogt et al., 1978). Für die Spaltung von C3 und C5 ist in beiden Fällen die Bb Untereinheit des Komplexes verantwortlich. Der C3bBb Komplex zerfällt bei 37 °C mit einer Halbwertszeit von etwa 1,5 Minuten (Fearon und Austen, 1975b, Medicus et al., 1976b), wobei Bb in inaktiver Form freigesetzt wird.

Eine Stabilisierung des Komplexes kann durch die Bindung von Properdin an C3b erfolgen. Durch die Bindung des Properdins kommt es zu einer nichtenzymatischen Konformationsänderung im C3bBb Komplex. Die durch Properdin stabilisierte C3 Konvertase C3bBbP (Medicus et al., 1976b, 1980) besitzt bei 37 °C eine auf 10 Minuten gesteigerte Halbwertszeit. Properdin ist zwar nicht essentiell für den alternativen Reaktionsweg (Medicus et al., 1976a, Schreiber und Müller-Eberhard, 1978, Schreiber et al., 1978, 1979, 1980), es steigert aber durch die Stabilisierung der C3/C5 Konvertase die Aktivierung. Die physiologische Funktion des Properdins ist also eine Stabilisierung des C3bBb zur verstärkten Aktivierung des alternativen Reaktionsweges, eine Aufgabe, die z.B. nach dem Eindringen von Bakterien in die Blutbahn zur Infektabwehr nötig ist (Lachmann und Hughes-Jones, 1984). Die C5 Konvertase C3bBbC3b mit der Untereinheit Bb als aktives Element ist ebenfalls ein instabiles Enzym, das durch spontanen Zerfall eine Halbwertszeit von nur wenigen Minuten hat.

1.3. Der Membran-Angriffs-Komplex (MAC).

Der MAC stellt das eigentliche "Killer-Molekül" des Komplementsystems dar (Müller-Eberhard, 1985). Nach der Entstehung der C5 Konvertase über den klassischen oder den alternativen Reaktionsweg wird die Komplementkaskade durch die Spaltung von C5 fortgesetzt. Es entstehen die beiden Fragmente C5a und C5b. Die Kaskade wird durch

Protein-Protein-Interaktion von C5b mit den folgenden Komponenten C6, C7, C8 und C9 weitergeführt, wobei es zu keiner weiteren Proteolyse kommt. Es handelt sich um ein sogenanntes "self-assembly", die Proteine fusionieren in geordneter Weise zu einem Komplex.

Die fünf Untereinheiten des MAC sind hydrophile Glycoproteine, die in wässriger Lösung vollständig löslich sind. Aktives C5b (C5b*) kann mit C6 einen löslichen und stabilen bimolekularen Komplex bilden. C5b* stellt den Ausgangspunkt der MAC-Bildung dar. Es besitzt eine metastabile spezifische Bindungsstelle für C6. Die begrenzte Stabilität der Bindungsstelle ist vermutlich auf die Ausprägung hydrophober Stellen zurückzuführen. Als Indiz dafür wird die Selbstaggregation von C5b* in der Abwesenheit von C6 angesehen (Arroyave und Müller-Eberhard, 1973, DiScipio et al., 1983). Die Halbwertszeit von C5b* ohne Interaktion mit C6 beträgt bei 37 °C 2,3 Minuten (Cooper und Müller-Eberhard, 1970). Trifft C5b* mit einem Molekül C6 zusammen, so bildet sich der bimolekulare C5b,6 Komplex, der lose an C3b gebunden ist und mit C7 reagieren kann.

Durch die Bindung von C7 wird aus dem hydrophilen C5b,6 der amphiphile C5b-7* Komplex, der eine metastabile Bindungsstelle für Membranen besitzt. C5b-7* ist in der Lage, die Position am C3b zu verlassen und sich an die Membranoberfläche zu binden. Es überwindet die Ladungsbarriere der Membran durch ionische Wechselwirkungen,

vermutlich unter Beteiligung der C5b,6 Untereinheit und verankert sich selbst durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der C7 Untereinheit fest im Bilayer der Membran (Podack et al., 1978b, Müller-Eberhard, 1985, Preissner et al., 1985a).

Die metastabile Bindungsstelle des C5b-7* kann aber auch von einem Regulationsfaktor, dem S-Protein besetzt werden. Eine solche Bindung erfolgt bei der Bildung des MAC in flüssiger Phase. Der SC5b-7 Komplex verbleibt dann im Serum und besitzt weiterhin hydrophile Eigenschaften. Auf die Wirkung des S-Proteins auf den MAC soll in einem anderen Abschnitt ausführlicher eingegangen werden.

Natives C8 besitzt keine erkennbare Affinität für Membranen, ist also auf die Funktion des C5b-7 angewiesen, der als C8-Rezeptor fungiert und durch die Anlagerung an die Membran den Ort des Membranangriffs bestimmt. Membran-gebundenes C5b-7 kann mindestens zwei verschiedene Funktionen für C8 ausüben. Es bindet C8 und ermöglicht die Insertion in die Membran (Podack und Tschopp, 1984). Welche der drei Untereinheiten des C5b-7 Komplexes welche Aufgabe erfüllt ist noch nicht geklärt. Die Bindungsstelle des C8 Moleküls ist auf seiner β -Kette lokalisiert (Monahan und Sodetz, 1980, 1981). Durch die Bindung des C8 Moleküls mit dem Komplex kommt es innerhalb des C8 zu einer Konformationsänderung, die der alpha-gamma Untereinheit erlaubt, in den hydrophoben Kern der Lipiddoppelschicht einzudringen (Tschopp et al., 1981).

Die letzte Komponente der Komplementkaskade, C9, kann von der C8 Untereinheit des C5b-8 Komplexes gebunden werden (Kolb et al., 1973). Dem Komplex fallen dabei zwei verschiedene Aufgaben zu. Einerseits vermittelt er die Bindung des C9 an den Komplex und damit an die Membran, andererseits ist er an der Polymerisation des C9 beteiligt (Podack und Tschopp, 1984). Lösliches C8 kann nur ein einziges C9 Molekül binden, auch wenn C9 im Überschuß vorliegt, während die Zahl der an einen C5b-8 Komplex gebundenen C9 Moleküle von 1-18 reichen kann (Tschopp et al., 1984, Podack, 1984, Tschopp et al., 1985). Der MAC ist also in Hinsicht auf seine Größe und Zusammensetzung variabel. Die Heterogenität beruht auf dem unterschiedlichen Gehalt an C9 und in der Sekundärstruktur des C5b-9 (Bhakdi und Trandum-Jensen, 1984, Tschopp, 1984, Tschopp et al., 1985).

Es besteht kaum noch Zweifel, daß die ringförmige bzw. zylindrische Membranläsion, die in elektronen-mikroskopischen Aufnahmen nach Einwirkung von Serum auf Bakterienzellen oder Erythrozyten sichtbar wird, aus einer Vielzahl von C9 Molekülen gebildet ist (Podack et al., 1982). Der genaue Mechanismus, durch den die C9 Polymerisation ermöglicht wird, ist noch nicht bekannt. Die Größe der durch den C5b-9 Komplex entstandenen Läsion wird von dem Verhältnis des gebundenen C9 zu C5b-8 bestimmt (Boyle et al., 1979, Ramm et al., 1985). Die Integration des Komplexes in eine Lipid-Membran

steht nicht in direktem Zusammenhang mit dem Grad der C9 Polymerisation. Amiguet et al. (1985) zeigen, daß sowohl tubuläres poly(C9) (hoher Grad der Polymerisation) als auch nicht-tubuläres poly(C9) (unvollständiger Ringschluß) erfolgreich in eine Erythrozyten- oder Liposom-Membran integriert wird.

Bisher ist nur der Aufbau und die Wechselwirkungen der einzelnen Proteine des MAC, nicht aber die Wirkung auf die Membran beschrieben worden. Erythrozyten und andere Zellen, die gegen Änderung des osmotischen Druckes empfindlich sind, können in Abwesenheit von Lysozym abgetötet werden. Lyse kann durch den C5b-8 Komplex ohne Mitwirkung des C9 erfolgen (Stolfi, 1968), ein Vorgang, der durch die erhöhte Durchlässigkeit der Membran bedingt ist. Bei den Erythrozyten führt die Bindung des C5b-9 Komplexes in sublytischer Konzentration zu einer partiellen Depolarisierung (Wiedmer und Sims, 1985), die in isotonischer Kochsalzlösung reversibel ist.

Die Wirkung des MAC auf *E. coli* ist mit Hilfe isolierter Proteine des alternativen Reaktionsweges von Schreiber et al. (1979) untersucht worden. Wenn diese Proteine in physiologischer Konzentration eingesetzt werden, binden bis zu 40.000 C9 Moleküle pro Bakterium innerhalb von Minuten. In Abwesenheit von Lysozym werden die Zellen zwar nicht lysiert, aber abgetötet. Der Vorgang ist sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch untersucht worden. Die Bakterienzellen schwellen deutlich an

und zeigen starke Unregelmäßigkeiten der Oberflächenstruktur. Bei der Transmissions-Elektronenmikroskopie werden zahllose Membranläsionen und eine teilweise Auflösung der äußeren Phospholipid-Membran sichtbar. Ähnliche Ergebnisse sind auch von Wilson und Spitznagel (1971) und Inoue et al. (1974, 1977) erzielt worden. Durch die Wirkung des Komplements kommt es zu einem Verlust an Lipiden der äußeren Bakterienmembran und zur Freisetzung der alkalischen Phosphatase (Kroll et al., 1983) und der 5'-Nukleotidase des periplasmatischen Raumes (Feingold et al., 1968, Inoue et al., 1968, Davis et al., 1969, Wright und Levine, 1981, Taylor und Kroll, 1983). Aus den Ergebnissen kann der Schluß gezogen werden, daß die Tötung von Bakterien auf eine Reorganisation und den Abbau des äußeren Bilayers durch C5b-9 zurückzuführen ist. Ein direkter Nachweis für die Zerstörung der äußeren Membran durch den MAC ist von Tesh et al. (1986) erbracht worden. Die Autoren beschreiben die Freisetzung von LPS bei gleichzeitiger Abtötung des E.coli Stammes.

Die Frage, ob der MAC neben der Integrität der äußeren Membran auch die der Zytoplasmamembran zerstört, wird kontrovers diskutiert. Neuere Untersuchungen von Whitlow et al. (1985) mit Erythrozyten-Membranen zeigen, daß C9 eines C5b-9 Komplexes in der Lage ist durch die Membran in den intrazellulären Raum zu gelangen, während eine solche Penetration für C8 nicht völlig zu beweisen ist.

Der hydrophobe Teil des MAC dringt nur 5 nm in die äußere Membran ein (Bhakdi, 1980), daher ist es nicht möglich, daß dieser Kanal durch die gesamte äußere Membran (7,5 nm), das Peptidoglycan (2,5 nm), den periplasmatischen Raum (7,5 nm) und die innere Membran (7,5 nm) hindurch reicht (Joiner et al., 1984b). Eine gleichzeitige Beschädigung der beiden Membranen könnte nur an den sogenannten "Bayer's junctions" (Bayer, 1968) erfolgen, also an bestimmten Regionen, in denen die innere und äußere Membran dicht zusammenliegen. Die Hypothese, daß nur an diesen Stellen effektive Läsionen entstehen, ist zuerst von Feingold et al. (1968) aufgestellt und später von Martinez und Carroll (1980) und Wright und Levine (1981) untermauert worden. Joiner et al. (1985c) beweisen für *Neisseria gonorrhoeae* nicht nur, daß der bakterizide MAC eine andere molekulare Konfiguration als der nicht-bakterizide MAC besitzt, sondern auch, daß er mit anderen Membranproteinen verbunden ist. Eine periodische Fusion des C5b-9 Komplexes, der in der äußeren Bakterienmembran eingelagert ist, mit der inneren Membran und daraus folgend ein plötzlicher Kalium-Verlust der Bakterienzelle, der zum Kollabieren des Membranpotentials führt und den Zelltod herbeiführt, wird von Born und Bhakdi (1986) zur Diskussion gestellt. Eine solche Fusion erklärt aber nicht die Beobachtungen von Taylor und Kroll (1984), die bei der Präparation von Membranen nach Inkubation eines serum-sensiblen Stammes von *E.coli* in Serum einen progressiven Verlust an

isolierbarer Zytoplasma-Membran feststellen. Dieser Verlust kann durch einen partiellen Abbau der Phospholipide der Zytoplasma-Membran erklärt werden.

1.4. Einfluß von Faktor H auf die Komplementaktivierung.

Nach der Bildung der initialen C3 Konvertase des alternativen Reaktionsweges kommt es durch die Amplifikation zu einer vermehrten Bildung von C3 Konvertase Molekülen. Eine wirksame Kontrolle dieses Mechanismus ist nötig. Sie erfolgt primär durch die Bindung des Plasmaproteins Faktor H ($\beta 1H$) (Whaley und Ruddy, 1976a).

Bei der Amplifikation bindet Faktor B an C3b, in Anwesenheit von Faktor H konkurriert dieser mit Faktor B. Die beiden Faktoren besitzen unterschiedliche Bindungsstellen auf dem C3b Molekül, anscheinend kann aber aus sterischen Gründen nur eine dieser Stellen besetzt werden (Pangburn und Müller-Eberhard, 1978). Die Affinität von Faktor H zu C3b ist von Mg^{++} Ionen abhängig (Kazatchkine et al., 1979). Es kann ein C3b,H Komplex entstehen, der schnell durch den Faktor I (=C3b Inaktivator, C3bINA) (Whaley und Ruddy, 1976b, Pangburn et al., 1977) inaktiviert wird. Im Serum ist Faktor H für die Inaktivierung von ungebundenem C3b durch Faktor I absolut notwendig, während gebundenes C3b auch ohne vorherige Anlagerung von Faktor H inaktiviert werden kann, seine Bindung die Effektivität des Faktors I aber wesentlich (etwa 30-fach) steigert (Pangburn et al., 1977).

Wie bereits bei der Beschreibung des alternativen Reaktionsweges erwähnt, kann die Oberfläche von Aktivatoren eine Schutzfunktion gegenüber der Anlagerung von Faktor H an C3b übernehmen. Fearon und Austen (1977 a,b) können zeigen, daß an die Oberfläche eines Aktivators des alternativen Reaktionsweges gebundenes C3b langsamer inaktiviert wird als C3b gebunden an einen Nicht-Aktivator. Aus späteren Arbeiten von Pangburn und Müller-Eberhard (1978), Pangburn et al. (1978) und Schreiber et al. (1978) geht hervor, daß sich dieser Effekt auf die Fähigkeit des gebundenen C3b zurückführen läßt. Das Regulationsprotein Faktor H kann also nicht zwischen einem Aktivator und einem Nicht-Aktivator unterscheiden. An Aktivatoren gebundenes C3b kann der Kontrolle durch den Faktor H entgehen, in dem Falle wird die Amplifikation also nicht beeinflusst. Eine Hypothese über den Mechanismus der Unterscheidung zwischen Aktivatoren und Nicht-Aktivatoren ist von Pangburn et al. (1980) aufgestellt worden. Die Autoren vermuten, daß eine Erkennungsstelle des C3b mit bestimmten Oberflächenstrukturen von Aktivatoren des alternativen Reaktionsweges interagieren kann und daß durch diese Wechselwirkung die Faktor H-Bindungsstelle des C3b verändert wird.

Faktor H kann aber nicht nur an das C3b Molekül binden, sondern auch innerhalb der C3/C5 Konvertase (C3bBb) das Bb Fragment abspalten (Weiler et al., 1976, Whaley und Ruddy, 1976a, Conrad et al., 1978, Nagaki et al., 1978,

Pangburn und Müller-Eberhard, 1978, Pangburn et al., 1978, Kazatchkine et al., 1979). Bei der Bindung von Faktor H an die C5 Konvertase kommt es zu einer Konkurrenz zwischen Faktor H und C5 um eine Bindungsstelle auf dem gebundenen C3b (Isenman et al., 1980). Unter Verwendung von Zymosanpartikeln als Aktivatoren des alternativen Reaktionsweges ist es DiScipio (1981) gelungen Hinweise darauf zu erhalten, daß die C5- und die Faktor H-Bindungsstelle auf dem C3b Molekül nicht identisch sind.

Faktor H ist auch in der Lage die Aktivierung von C5 durch zellgebundene C5 Konvertase des klassischen Reaktionsweges zu unterbinden, wie bereits von Whaley und Ruddy (1976a) beobachtet worden ist. Weitere Untersuchungen sind von Ito und Tamura (1983) mit EAC1,4b,2a,3b Zellen durchgeführt worden. Falls die Zellen nur wenige C3b Bindungsstellen besitzen, so hat Faktor H auch nur einen geringen Einfluß auf die C5 Bindung an die Zellen. Je größer aber die Zahl der C3b-Bindungsstellen auf den Erythrozyten ist, desto größer ist auch die Wirkung von Faktor H. Weil dieser Vorgang auch mit einem verminderten Verbrauch von C5 korreliert ist, kann vermutet werden, daß Faktor H durch seine Bindung an die C5 Konvertase deren Aktivität herabsetzt. Die Regulation erfolgt also vor der Aktivierung des C5 und ist nicht auf die Behinderung der Bindung des aktivierten C5 an die Zellen zurückzuführen.

Nachdem Faktor H an C3b gebunden ist, kann er als Ko-faktor für Faktor I dienen. Faktor I spaltet die α -Kette des C3b an zwei nahe beieinander gelegenen Stellen, wobei ein kleines Peptid, C3f, mit einem Molekulargewicht von etwa 3.000 herausgetrennt wird. Das verbleibende größere Produkt wird iC3b genannt und kann weder mit Faktor B, noch mit C5 oder einem weiteren Faktor H Molekül reagieren. Nach der Inaktivierung des C3b zu iC3b wird das Faktor H Molekül losgelöst, es kann an ein weiteres C3b Molekül binden. iC3b wird, falls es an einen C3b Rezeptor (CR1) z.B. auf humanen Erythrozyten gebunden ist, durch Faktor I weiter zu C3d,g und C3c gespalten (Lachmann und Hughes-Jones, 1984).

Als Aktivatoren des alternativen Reaktionsweges sind bisher unter anderem Polysaccharide, Lipopolysaccharide, verschiedene Immunglobuline (Fries et al., 1984), Viren, Pilze, Bakterien (Brown et al., 1983) und einige Tierzellen und Parasiten identifiziert worden (Übersichtsartikel siehe Götze und Müller-Eberhard, 1976). Eine gemeinsame Struktur oder stoffliche Grundlage für die Aktivatoreigenschaft ist bisher nicht gefunden worden. Allerdings ist es in einigen Experimenten gelungen, durch chemische Veränderungen einen Nichtaktivator in einen Aktivator umzuwandeln. Durch enzymatische Entfernung von etwa 80 % der zellgebundenen Sialinsäure von Schafserythrozyten kann das Verhältnis von Faktor H zu zellgebundenem C3b von 1,0 auf 0,3 reduziert werden. Die

Erythrozyten können also nach dieser Behandlung als Aktivatoren des alternativen Reaktionsweges wirken (Fearon, 1978, Pangburn und Müller-Eberhard, 1978, Kazatchkine et al., 1979). In den Versuchen von Fearon (1978) ist eine direkte Proportionalität zwischen der Menge entfernter Sialinsäure und der reduzierten Faktor H Effektivität gefunden worden.

In einem anderen Versuchsansatz von Pangburn et al. (1980) ist E.coli-LPS in die Membran von Schafserythrozyten inkorporiert und diese dann in C4-depletiertem Humanserum inkubiert worden. Die Aktivierung des Komplements durch die modifizierten Erythrozyten ist sowohl mit Hilfe des Faktor H/C3b Indexes als auch durch einen CH_{50} bewiesen worden. Auch dieser Versuchsansatz macht deutlich, daß die Oberflächenstrukturen an die C3b bindet über die Interaktion von C3b mit Faktor H einen Einfluß auf die Aktivierung des alternativen Reaktionsweges bzw. den Abbruch der Amplifikation besitzen.

1.5. Einfluß des S-Proteins auf den MAC.

Nach der Auftrennung eines aus frischem Humanserum nach Inkubation mit Inulin, Zymosan oder Immunkomplexen isolierten MAC kann im Gel eine Proteinbande entdeckt werden, die keiner der für den MAC erforderlichen späten Komplementkomponenten entspricht (Kolb und Müller-Eberhard, 1975, Podack et al., 1976). Die Untersuchungen

von Podack et al. (1976) zeigen bereits, daß sich diese Untereinheit des MAC (S-Protein) an die Membranbindungsstelle des sich bildenden Komplexes auf der C5b,6,7 Stufe anlagert. Das S-Protein konkurriert mit Membranlipiden um die metastabile Bindungsstelle des C5b-7 Komplexes und verhindert durch seine Bindung die Anlagerung an die Zelloberfläche. C5b-7 wird von dem aktivierenden Partikel abgelöst (Kolb und Müller-Eberhard, 1973) und das S-Protein bindet. Der entstandene lösliche SC5b-7 Komplex setzt sich aus je einem Molekül C5b, C6 und C7 sowie drei Molekülen S-Protein zusammen (Kolb und Müller-Eberhard, 1975). Der Komplex bindet auch noch C8 und drei Moleküle C9 (Podack et al., 1977). Das S-Protein ist weder von Bhakdi et al. (1976) noch von Ware et al. (1981) als Bestandteil eines erythrozytengebundenen MAC nachgewiesen worden.

Das S-Protein unterdrückt zusätzlich die Polymerisation von C9 durch den SC5b-8 Komplex (Podack et al., 1984). Deshalb kann als hauptsächlicher Strukturunterschied zwischen SC5b-9 und MAC das Fehlen des tubulären poly(C9) angesehen werden. Im Gegensatz zu dem membranengebundenen MAC, der nach der Formel C5b-9_n gebildet wird, enthält der SC5b-9 Komplex nur 2-3 Moleküle C9, die weniger stark gebunden sind (Kolb und Müller-Eberhard, 1975), so daß die Möglichkeit besteht sie abzulösen. Diese C9 Moleküle sind weiterhin hämolytisch aktiv (Kolb und Müller-Eberhard, 1973, Kinoshita et al., 1979).

Der membranolytische MAC besitzt amphiphile Eigenschaften, wogegen der SC5b-9 Komplex hydrophil ist. Nach dem Abtrennen des S-Proteins verfügt der Komplex erneut über amphiphile Eigenschaften, die eine Verbindung dieses C5b-9 Komplexes mit einer Lipiddoppelschicht-Membran und die Bildung von Strukturen, die normalen Komplementläsionen ähneln, ermöglichen (Podack et al., 1978a, Bhakdi et al., 1979, Podack und Müller-Eberhard, 1980).

Nach der Entfernung des S-Proteins aus dem SC5b-9 Komplex kann es zur Polymerisation des C9 kommen. Für eine erfolgreiche Bildung des poly(C9) wird dann eine Reihe von zusätzlichen C9 Molekülen benötigt (Müller-Eberhard, 1984). Podack et al. (1984) können zeigen, daß es bei der Mischung von gereinigtem C5b, C6, C7, C8 und einem Überschuß an C9 zur Bildung von poly(C9) kommt. Der Vorgang kann aber durch die Zugabe von S-Protein dosisabhängig inhibiert werden.

1.6. Molekulare Grundlagen der Serumresistenz.

Eine Reihe von Bakterienstämmen verschiedener Spezies werden nicht durch das Komplementsystem abgetötet. Diese serum-resistenten Stämme besitzen also einen Abwehrmechanismus gegen die bakterizide Wirkung des Serums. Bei Vergleichen von serum-sensiblen mit -resistenten Stämmen versuchen verschiedene Autoren die Eigenschaft Serumresistenz mit einzelnen Komponenten der Bakterienoberfläche bzw. der äußeren Membran zu verbinden.

Die umfangreiche Literatur, in der ein Bakterienbestandteil mit der Serumresistenz in Beziehung gesetzt wird, läßt sich grob betrachtet wie folgt aufteilen:

- a) Publikationen, die entweder die Menge des LPS oder seine Zusammensetzung als Grundlage für die Resistenz sehen,
- b) Veröffentlichungen über den Zusammenhang von Kapsel-Antigen (meistens K1) und Serumresistenz und
- c) Artikel, in denen ein Protein der äußeren Membran (häufig plasmidkodiert) mit der Resistenz verbunden zu sein scheint.

Glattstämme mit einem hohen Gehalt an langkettigem LPS sind im allgemeinen weniger empfindlich gegenüber der bakteriziden Wirkung des Komplementsystems als Rauhschlämme, die eine geringere Menge an LPS aufweisen (Wardlaw, 1963, Nelson und Roantree, 1967, Rowley, 1968, Feingold, 1969, Morrison und Kline, 1977, Goldman et al., 1984, Sansano et al., 1985). Die E.coli Mutante J-5, die ohne Galaktose im Nährmedium als Rauhschlämme ohne O-spezifische Seitenketten wächst, bei Zugabe des Zuckers aber komplettes LPS ausbildet, ist von Sansano et al. (1985) auf ihre Serumresistenz untersucht worden. Nach Anzüchtung in Nährmedium mit Galaktose weist der Glattstamm erhöhte Serumresistenz auf, verbunden mit geringerem Komplementverbrauch und verminderter Antikörperbindung im Vergleich zur Rauhschlämme. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß die O-spezifischen Seitenketten des

LPS sterisch die Anlagerung von Antikörpern und damit die Aktivierung des klassischen Reaktionsweges verhindern.

Joiner et al. (1986) zeigen hingegen Komplementaktivierung trotz eines hohen LPS-Gehaltes. Ein Stamm von *Salmonella montevideo* bindet über den alternativen Reaktionsweg C3 bevorzugt an die langkettigen LPS Moleküle, dabei kommt es aber nicht zu einer Abtötung der Bakterien (Zugabe von IgG führt zu deutlicher Reduktion der cfu). Das LPS stellt für große Moleküle eine sterische Barriere dar, welche diese daran hindert die äußere Membran zu erreichen. Der C5b-9 Komplex mit einem Molekulargewicht von 1 Million oder mehr dürfte ebenfalls durch das LPS an seiner Integration gehindert werden. Eine ähnliche Hypothese für *E.coli* haben auch Goldman et al. (1984) und Taylor und Kroll (1984) aufgestellt. Die Annahme, daß dem LPS eine Schutzwirkung gegenüber der bakteriziden Wirkung des Serums zukommt, wird durch diese Untersuchungen bestätigt, während in anderen Fällen serum-resistente Rauhsämme isoliert werden können.

Für eine Reihe dieser Rauhsämme kann der Besitz einer K1-Kapsel nachgewiesen werden (Gemski et al., 1980, Opal et al., 1982, Cross et al., 1984a). Die Autoren postulieren für einige Stämme aufgrund des Vergleiches von K1-positiven und -negativen Stämmen einen direkten Zusammenhang zwischen Kapselbesitz und Serumresistenz.

In den Arbeiten von Cross et al. (1984a) und Van Dijk et al. (1979a) sind jeweils eine große Anzahl von serum-resistenten Blutkulturstämmen in Hinblick auf den Besitz der K1 Kapsel untersucht worden. Ebenso wie Björkstén et al. (1976), Olling (1977) und Bortolussi et al. (1979) kann in den oben zitierten Artikeln das Vorhandensein der K1-Kapsel nicht als alleinige Ursache für die Serumresistenz gesehen werden, weil auch eine Anzahl K1-negativer Stämme Resistenz aufweist. Andererseits ist es auch möglich, daß K1 bei einigen Stämmen Resistenz vermittelt, während andere trotz der Kapsel vom Komplementsystem abgetötet werden.

Ein zusätzlicher Faktor eventuell in Zusammenhang mit der Kapsel scheint erforderlich. Eine Anzahl von Proteinen (meist plasmidkodierte Genprodukte) sind bisher als molekulare Basis für Serumresistenz beschrieben worden. Es ist zwar in NHS nicht möglich eine relevante Erhöhung der Resistenz zu erzielen, in anderen Seren z.B. Meerschweinchen- oder Kaninchenserum kommt es aber zu Resistenzsteigerungen. Die Mehrzahl der Untersuchungen beschäftigt sich mit dem traT-Protein (Reynard und Beck, 1976, Reynard et al., 1978, Ogata und Levine, 1980, Moll et al., 1980, Timmis et al., 1981, Binns et al., 1982, Timmis et al., 1985). Über 200 klinische Isolate verschiedener Bakterienspezies sind von Kanukollu et al. (1985) auf den Besitz des traT-Genes untersucht worden. Diese DNA-Sequenz kann in 58 %

der E.coli Stämme und zwar sowohl bei serum-resistenten als auch bei -sensiblen Stämmen gefunden werden. Der Resistenztest ist mit 20 % NHS durchgeführt worden.

Ein anderes Genprodukt (iss) des Plasmides ColV,I-K94 wird nicht in der traT-Region des Plasmids kodiert (Binns et al., 1979, Ogata et al., 1982), führt aber ebenfalls in Kaninchenserum zu einer leichten Resistnzerhöhung. Eine solche Resistenzsteigerung kann auch nach Aufnahme anderer Colizin V-Plasmide in den Laborstamm K12 beobachtet werden (Nilius und Savage, 1984). In weiteren Arbeiten (Smith, 1974, Fietta et al., 1977, Wretlind et al., 1985) ist gezeigt worden, daß die Erhöhung der Serumresistenz auch mit anderen hier nicht näher beschriebenen Plasmiden innerhalb verschiedener Bakterienspezies übertragen werden kann.

Alle diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Modulation der äußeren Oberfläche der Bakterienzelle als Angriffspunkt für den C5b-9 Komplex durch langkettige LPS, Kapsel oder veränderte Zusammensetzung der äußeren Membran entweder die Aktivierung des Komplementsystems verhindern kann oder den Zugang für das Effektormolekül blockiert.

1.7. Mechanismus der Serumresistenz.

Zur Abtötung von Bakterien durch Serum ist die Aktivierung der gesamten Komplementkaskade sowie die Bildung eines MAC und dessen Insertion in die äußere Bakterien-

membran erforderlich. Eine Reihe von Mechanismen sind daher als Grundlage für die Serumresistenz denkbar. Sowohl der Abbruch der Komplementaktivierung als auch die Blockierung der MAC-Bildung oder eine Verhinderung der Integration des MAC in die äußere Membran stellen mögliche Ursachen der Resistenz von Bakterienstämmen gegenüber der bakteriziden Wirkung des Serums dar.

Joiner et al. (1982 a,b) ist es erstmals gelungen mit Hilfe des serum-resistenten Stammes *Salmonella minnesota* S218 einen Mechanismus der Serumresistenz darzustellen. In den Untersuchungen ist der Verbrauch an C3, C5, C7 und C9 durch den resistenten und einen sensiblen Stamm mit Hilfe hämolytischer Tests gemessen worden. Nach einer Inkubation von 15-20 Minuten in 10 % NHS kann sowohl in dem Serum mit dem sensiblen als auch mit dem resistenten Stamm nur noch etwa 20 % der C3 Aktivität nachgewiesen werden. Die erreichten Werte sind für die beiden Stämme vergleichbar. Anders verhält es sich bei den ebenfalls getesteten späten Komplementkomponenten. Der sensible Stamm (Re595) verbraucht während einer einstündigen Inkubation in 10 % NHS nahezu kein C5, etwa 10 % C7 und 26 % C9. Im Gegensatz dazu wird durch den resistenten Stamm S218 bereits nach 5 Minuten die gesamte C9 Aktivität und nach 15 Minuten 95 % der C5- und C7-Aktivität verbraucht. Zusammenfassend kann also festgehalten werden, daß nach etwa gleicher Reduktion der C3-Aktivität im Serum durch die beiden Stämme der

resistente Stamm die C5-, C7- und C9-Aktivität fast völlig depletiert, während der sensible Stamm trotz gleichzeitiger Abtötung wesentlich geringere Mengen der Komponenten verbraucht.

Die nachfolgenden Bindungsstudien mit radioaktiv-markiertem C5, C7 und C9 zeigen, daß der resistente Stamm schnell große Mengen an C5 und C7 bindet, nach etwa 15 Minuten ist das Maximum (C5 etwa 6×10^3 , C7 etwa 5×10^3 Moleküle/cfu) erreicht. Danach reduziert sich die Menge der gebundenen Moleküle und nach 60 Minuten ist an dem resistenten Stamm (verglichen mit dem sensiblen Stamm) etwa die gleiche Anzahl an C5 und C7 Molekülen pro cfu angelagert. Der sensible Stamm bindet nach 15 Minuten 2×10^3 Moleküle C5 und C7 pro cfu und erreicht damit den Endpunkt der Reaktion. Bei der C9 Bindung zeigt sich ein anderes Bild. An den sensiblen Stamm lagern sich bereits nach 15 Minuten etwa 9×10^3 Moleküle C9/cfu an und dieser Wert bleibt für den Versuchszeitraum (60 Min.) konstant, während bei dem resistenten Stamm nach wenigen Minuten 3×10^3 Moleküle binden und es danach zu einem Absinken der Zahl der gebundenen Moleküle kommt. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Anzahl der zellgebundenen C9 Moleküle des resistenten Stammes im Vergleich zu dem sensiblen Stamm stets deutlich reduziert ist (Joiner et al., 1982a).

Dieser Mechanismus der Serumresistenz blockiert also nicht die Aktivierung der Komplementkomponenten oder die

Anlagerung der terminalen Komponenten an die Bakterienoberfläche, sondern er scheint mit dem Nachlassen der Bindung der Komponenten an die Oberfläche verbunden zu sein. In weiteren Untersuchungen mit C8-defizientem Serum ist gezeigt worden, daß C5b-7 bei beiden Stämmen an die Bakterien bindet und erst die Zugabe von C8 oder C8 und C9 eine dosis-abhängige Freisetzung des gesamten terminalen Komplexes (C5b-8 bzw. C5b-9) von der Bakterienoberfläche bewirkt. Dieser Komplex kann im Überstand mit Hilfe der Dichte-Gradienten-Ultrazentrifugation nachgewiesen werden.

Eine mögliche Erklärung für den beschriebenen Mechanismus sehen Joiner et al. (1982b) in einer Steigerung der Hydrophobizität des Komplexes nach der Anlagerung von C8 und einer mengenmäßigen Abnahme der ionischen Bindungen im dabei entstandenen Komplex. Es ist denkbar, daß der C5b-8 bzw. der C5b-9 Komplex dann nicht mehr durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der äußeren Membran der serum-resistenten Bakterien verbunden ist. Es gibt einige Ergebnisse, die diese Theorie stützen, andere sprechen dagegen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der von Joiner et al. (1982a,b) beschriebene Mechanismus der Serum-resistenz auf der Freisetzung des C5b-9 Komplexes beruht, der sich nach erfolgreicher Aktivierung und Bindung durch den serum-resistenten Stamm auf der Oberfläche der Bakterien gebildet hat. Der Komplex ist

nicht bakterizid, weil er nicht in die hydrophoben Regionen der äußeren Membran inserieren kann.

Die Ursache für die fehlende Integration des MAC wird auf eine andersartige Wechselwirkung des Komplexes mit Oberflächenstrukturen des Bakteriums zurückgeführt. Joiner et al. (1986) sieht in der Lokalisation des MAC ein wichtiges Kriterium für seine Effektivität. IgG Antikörper gegen Bakterienbestandteile binden an die Oberfläche und legen die Stelle für die C3b Deposition fest, der später die C5b-9 Anlagerung folgt. Die Wichtigkeit dieser räumlichen Anordnung wird durch verschiedene Arbeiten belegt. Joiner et al. (1984a) beobachten, daß in der Abwesenheit von Antikörpern der C5b-9 Komplex nicht in hydrophobe Regionen der äußeren Membran des E.coli Stammes O111 eingefügt wird, was aber bei Anwesenheit entsprechender Antikörper erfolgt. Bei einem anderen E.coli Stamm (12015) erhöht die Zugabe spezifischer IgG Antikörper die Abtötung über den alternativen Reaktionsweg, obwohl es unter diesen Bedingungen nur zu einer leicht gesteigerten C3 Bindung kommt (Joiner et al., 1985a). Diese gesteigerte bakterizide Aktivität ist also nicht auf eine erhöhte Anzahl an gebundenen C3b-Molekülen oder C5b-9 Komplexen sondern auf die Lokalisation oder die Form des angelagerten Komplexes zurückzuführen.

1.8. Zielsetzung der Arbeit

In den Arbeiten von Joiner et al. (1982 a,b) ist als Grundlage für die Serumresistenz bei *Salmonella minnesota* die Freisetzung des membranolytischen C5b-9 Komplexes von der bakteriellen Zelloberfläche beschrieben worden. Dieser Mechanismus der Serumresistenz kann auch Stämme der Spezies *E.coli* vor der bakteriziden Wirkung des Serums schützen (Joiner et al., 1984 b). In diesem Zusammenhang erscheinen zwei Fragen von besonderer Bedeutung:

- (1) welches sind die molekularen Ursachen der Serumresistenz und
- (2) welche Auswirkungen haben diese Stoffe auf die Interaktion des Komplements mit dem Bakterium ?

Zur Klärung dieser Fragen sollen serum-resistente Wildstämme mit ihren serum-sensiblen Mutanten (Transkonjuganten) verglichen werden. In vorangegangenen Untersuchungen über plasmidvermittelte Antibiotikaresistenz sind nach der Konjugation der Wildstämme Wf8, Wf26 und Wf52 mit dem Stamm W3110 K12 R6K Transkonjuganten isoliert worden, die nicht nur die durch das Plasmid R6K kodierten Antibiotikaresistenzen aufweisen, sondern auch durch den Verlust der Serumresistenzeigenschaft charakterisiert sind (Kubens und Opferkuch, Manuskript in Vorbereitung). Die dabei gewonnenen isogenen Pärchen eignen sich wesentlich besser für Untersuchungen über die molekularen Grundlagen der Serumresistenz als die

sonst für derartige Vergleiche benutzten Stämme (häufig ein hochsensibler Laborstamm z.B. *E.coli* K12 verglichen mit einem pathogenen Wildstamm), weil stammspezifische Besonderheiten nicht berücksichtigt werden müssen.

Die Charakterisierung der Wf-Stämme und ihrer Mutanten in Bezug auf zelluläre Strukturen wie Kapsel, Protein- und LPS-Muster der äußeren Membran, sowie funktionelle Unterschiede insbesondere die verschieden starke Ausprägung der Serumresistenz soll erste Aufschlüsse über die molekularen Ursachen der Serumresistenz geben. Weiterhin ist zu prüfen, über welchen Reaktionsweg die Komplementaktivierung erfolgt und ob die serum-resistenten Wildstämme diese Eigenschaft mit Hilfe des von Joiner et al. (1982a,b) beschriebenen Mechanismus erreichen. In Ergänzung zu den bereits in der Literatur beschriebenen Ergebnissen soll der Zeitpunkt der MAC-Freisetzung, sowie dessen Zusammensetzung und eventuell auch der Einfluß von Regulationsfaktoren untersucht werden.

Bei der Untersuchung anderer Bakterienspezies als *Salmonella minnesota* oder *E.coli* ist es nicht gelungen, die Freisetzung des MAC bei serum-resistenten Stämmen nachzuweisen. Harriman et al. (1982) beschreiben für *Neisseria gonorrhoeae* und Joiner et al. (1983a) für *Streptococcus pneumoniae* die Aktivierung und den Verbrauch der späten Komplementkomponenten sowie die Anlagerung eines C5b-9 Komplexes an die Bakterien ohne

Abtötung oder Freisetzung des MAC. Diese unterschiedlichen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß es mehr als einen Mechanismus der Serumresistenz gibt.

Erste Anhaltspunkte dafür, daß auch innerhalb einer Spezies verschiedene Mechanismen der Serumresistenz zugrunde liegen, sind durch Vorversuche mit 53 frisch isolierten E.coli Blutkulturstämmen erhalten worden. Die Stämme sind durch unterschiedliche Bindungsmuster von C3b, Faktor H und C5 im Immunofluoreszenztest gekennzeichnet. Die Bakterien sind aufgrund dieser Muster in drei Gruppen eingeteilt worden (Wettstein et al., 1986). Anhand der Vorversuche ergeben sich folgende Fragen, die in der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht werden sollen:

- (1) ist die Komplementaktivierung innerhalb der Gruppen trotz unterschiedlicher Bindungsmuster gleich,
- (2) repräsentieren die verschiedenen Bindungsmuster unterschiedliche Mechanismen der Serumresistenz,
- (3) handelt es sich bei dem oder einem der Mechanismen um den bereits von Joiner beschriebenen,
- (4) falls ein oder mehrere neue Mechanismen entdeckt werden, gelingt es molekulare Faktoren mit dem einen oder anderen Mechanismus in Verbindung zu bringen ?

Zur Klärung dieser Fragen sollen mehrere Vertreter verschiedener Gruppen (unterschiedliche Bindungsmuster im Immunfluoreszenztest) ausgesucht und untersucht werden. Bei zwei der drei Gruppen sind in Bezug auf die Anlagerung der Komplementkomponenten C3 und C5 sowie des

Faktors H gegensätzliche Ergebnisse zu beobachten (Gruppe I C3- und C5-Anlagerung, kein Faktor H-Nachweis, Gruppe II keine C3- und C5-Anlagerung, Faktor H-Nachweis). Es kann vermutet werden, daß die bereits durch die Bindungsmuster gezeigten Unterschiede in Bezug auf die Komplementaktivierung einen wesentlichen Einfluß auf den Mechanismus der Serumresistenz besitzen. Die ersten beiden Gruppen erscheinen aufgrund dieser deutlichen Unterschiede für die Versuche besonders geeignet. Aus diesem Grunde sind je 8 Vertreter dieser Gruppen für die Versuche verwendet worden. Sie sollen in Hinblick auf ihren Sero- und Kapseltyp, sowie ihre Serumresistenz untersucht werden. Die in Vorversuchen erhaltenen Bindungsmuster sind zu überprüfen und durch quantitative Versuche über den Komplementverbrauch bzw. die Anlagerung markierter Komponenten an die Bakterien zu bestätigen. Eine Bestimmung des Reaktionsweges der Komplementaktivierung und weitergehende Untersuchungen der Bakterien in Hinblick auf Bestandteile der Zellhülle sollen Aufschluß über die molekularen Ursachen der Resistenz geben.

2. Material und Methoden

2.1. Material.

2.1.1. Bakterienstämme.

Bei den Wildstämmen Wf8 (06:K13:H-), Wf26 (06:K13:H31) und Wf52 (026:B6:H11) handelt es sich um klinische Isolate von E.coli (Wf8 und Wf26 Harnwegsinfekt, Wf52 Sepsis), die uns freundlicherweise von Prof. A.A.Glynn, St. Mary's Hospital, London zur Verfügung gestellt wurden.

Bei den mit BK bezeichneten E.coli-Stämmen handelt es sich um institutseigene Blutkulturisolate von Bakteriämie-Fällen der Jahre 1981-1984. Die Identifizierung der Bakterien wurde mit dem System API 20E (Bunte Reihe, API-System, La Balone les Grottes, Montalieu-Vercien, Frankreich) vorgenommen. Die Serotypisierung mittels Objektglas- und Röhrchen-Agglutination erfolgte am Hygienischen Institut der Gesundheitsbehörde Hamburg.

Bei dem Stamm W3110 K12 R6K handelt es sich um einen das Antibiotikaresistenzplasmid R6K tragenden Laborstamm, der als Donor für Konjugationsexperimente benutzt wird.

2.1.2 Medien, Puffer und Lösungen.

Nährmedien

C.L.E.D.-Agar, Iso-Sensitest Bouillon, N1-Bouillon, N1-Agar und TSA (Tryptic Soya Agar) wurden von Oxoid, Müller-Hinton Bouillon von Merck bezogen.

Puffer und Lösungen

5 x Denhardt	0,1 % Ficoll
-----	0,1 % Polyvinylpyrrolidon
	0,1 % BSA (nukleasefrei)
Elektrophoresepuffer	71,30 g Glycin
-----	15,13 g Tris
	5,00 g SDS
	ad. 5 l H ₂ O
Entfärbelösung	360 ml Methanol
-----	120 ml Essigsäure
	ad. 2 l H ₂ O
Färbelösung	0,7 g Coomassie-Blue (R250)
-----	230 ml 50 % Methanol
	23 ml Essigsäure
	ad. 2 l H ₂ O
Gelatinelösung	1,25 g Gelatine
-----	0,22 g KCr(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O
	ad. 250 ml Aqua dest.

Lösung A -----	10,00 g Na_2CO_3 0,85 g Kaliumnatriumtartrat 5,00 g SDS 50,00 ml 1 N NaOH ad. 500 ml H_2O
Lösung B -----	4 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ ad. 100 ml H_2O
Lösung C -----	0,1 ml 1,0 M MOPS pH 7,0 1,0 ml 0,1 M RbCl_2 ad. 10 ml H_2O
Lösung D -----	1 ml 1,0 M MOPS pH 6,5 1 ml 0,1 M RbCl_2 1 ml 0,5 M CaCl_2 ad. 10 ml H_2O
Lösung 4 -----	210 ml 0,36 % NaOH 14 ml NH_4OH 40 ml (8g AgNO_3 in 40 ml Aqua bideest.) ad. 1 l H_2O
Lösung 6 -----	0,5 g Zitronensäure 542,9 μl Formaldehyd ad. 1 l H_2O
Lysozym-Lösung -----	20 mg/ml Lysozym in H_2O ge- löst
Mg-EGTA-Puffer -----	0,142 M NaCl 0,007 M 5,5-Diethylbarbitur- säure Natriumsalz 0,008 M EGTA 0,004 M Mg-Sulfat auf pH 7,2 eingestellt
Na-Arsenitlösung -----	2,6 % w/v NaAsO_2 in 0,5 N HCl
PBS-Puffer (pH 7,4) -----	0,15 M NaCl 2,0 mM KH_2PO_4 8,0 mM Na_2HPO_4
Periodsäurelösung -----	0,04 M H_2JQ_6 in 0,125 N H_2SO_4
Phenol (pH 8,0) -----	Phenol mit 50 mM Tris auf pH 8,0 eingestellt
Probenpuffer -----	10 mg Bromphenolblau 20 ml Glycerin 5 ml Mercaptoäthanol 2 ml 10 % SDS 25 ml 0,25 M Tris-HCl pH 6,8 ad. 100 ml H_2O

Reagenz A	6 g $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O}$ in 20 ml H_2O
Saccharose-Tris-Puffer	25 % Saccharose 50 mM Tris auf pH 8,0 eingestellt
Saccharose/Tris-EDTA Lösung	25 % Saccharose 50 mM EDTA 50 mM Tris auf pH 8,0 eingestellt
10 x SSC (pH 7,0)	1,5 M NaCl 0,15 M Natriumcitrat
Stock Lösung I	44,0 g Acrylamid 0,8 g Bisacrylamid ad. 100 ml H_2O
Stock Lösung II	30,0 g Acrylamid 0,8 g Bisacrylamid ad. 100 ml H_2O
Substratlösung	15 mg 4-chloro-1-naphtol 5 ml Methanol 25 ml TBS-Puffer 10 μl H_2O_2
TBS-Puffer	50 mM Tris 150 mM NaCl
TE-Puffer (pH 7,4)	10 mM Tris 1 mM EDTA
TES-Puffer (pH 7,4)	0,05 M Tris 0,01 M EDTA 0,5 M Saccharose
Thiobarbitolsäurelösung	0,6 % Thiobarbitolsäure in H_2O
Tris-Barbitalpuffer	5,6 g 5,5-Diethylbarbitursäure Natriumsalz 11,1 g Tris 0,134 g Calciumlactat 0,1 g Natriumazid in 800 ml H_2O lösen mit 2 N HCl auf pH 8,6 einstellen ad. 1 l mit H_2O
Triton X-Lösung	10 %ig in 50 mM EDTA 50 mM Tris pH 8,0

VBS-Puffer	0,3 g/l	Gelatine
-----	0,15 mM	CaCl ₂
	1,0 mM	MgCl ₂
	0,15 M	NaCl
	4,94 mM	5,5-Diethylbarbitursäure Natriumsalz
		auf pH 7,3 einstellen

VBS-Glucose-Puffer	0,15 g/l	Gelatine
-----	0,075 mM	CaCl ₂
	0,50 mM	MgCl ₂
	75 mM	NaCl
	2,5 mM	5,5-Diethylbarbitursäure Natriumsalz
	126 mM	D(+)-Glucose (Monohydrat)
		auf pH 7,3 einstellen

VBS-S Puffer	0,3 g/l	Gelatine
-----	0,17 M	D(-)-Saccharose
	60,00 mM	NaCl
	1,00 mM	MgCl ₂
	0,15 mM	CaCl ₂
	4,95 mM	5,5-Diethylbarbitursäure Natriumsalz
		auf pH 7,3 einstellen

2.1.3. Antiseren.

Anti-Human C3-Globulin, FITC-markiert (Ziege);
Atlantic Antibodies ATAB, Scarborough, Me., USA.

Anti-Human Faktor H-Globulin, FITC-markiert (Ziege);
Atlantic Antibodies ATAB, Scarborough, Me., USA.

Anti-Ziegen IgG-Globulin, FITC-markiert (Kaninchen);
E.Y. LABS, San Mateo, Ca., USA.

Anti-Human C5-IgG (Ziege);
Atlantic Antibodies ATAB, Scarborough, Me., USA.

2.1.4. Komplementkomponenten

C3 (Human), C5 (Human), C6 (Human), C7 (Human), C8 (Meerschweinchen), C9 (Meerschweinchen)
Cordis Laboratories, Miami, Fa., USA. Titer jeweils 5000 CH₅₀ Einheiten/ml.

C2 (Human)

Aus Humanserum isoliert durch differentielle Ammoniumsulfatfällung mit nachfolgender Reinigung durch Säulenfiltration über eine Diethylaminethyl-Zellulose (DEAE DE 32) - Säule.

2.1.5. Chemikalien.

Die verwendeten Chemikalien sind, falls nicht anders gekennzeichnet, von Merck, Serva, Roth oder LKB im höchste Reinheitsgrad bezogen worden.

2.2. Methoden.

2.2.1. Konjugation.

Beide Stämme (Donor und Rezipient) über Nacht in Müller-Hinton Bouillon wachsen lassen. Am folgenden Tag wird die Übernachtskultur im Verhältnis 1:20 verdünnt und im Schüttelwasserbad für etwa 2 Std. bis zu einer optischen Dichte von 0,8 bei 37 °C inkubiert. Donor und Rezipient werden danach im Verhältnis 1:1 (je 2,5 ml) gemischt und sofort für 10 min. bei 5.000 Upm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 0,2 ml Nährmedium N1 resuspendiert und die Bakteriensuspension auf einem Millipore-Filter (0,45 µm) verteilt, der auf eine N1-Agarplatte gelegt wird. Der Filter wird bei 37 °C für 3 Std. inkubiert. Mit einer sterilen Pinzette wird der Filter in einen sterilen 100 ml Erlenmeyer-Kolben gegeben und die Zellen mit 5 ml 0,9% NaCl abgespült. Die Bakteriensuspension enthält nun Donor, Rezipienten und eventuelle Transkonjuganten. Zur Selektion der Transkonjuganten wird die Bakteriensuspension je nach der erwarteten Frequenz verdünnt und jeweils 0,2 ml der Mischkulturen und als Kontrolle auch die Ausgangsstämme auf Doppelantibiotika-Platten ausgespatelt. Nach einer erneuten Inkubation bei 37 °C dürfen nur Transkonjuganten auf diesen Platten wachsen. Die Resistenzeigenschaften der hierbei erhaltenen Kolonien sind aber vorsichtshalber noch einmal zu überprüfen.

2.2.2. DNA-Isolation (Plasmide).

30 ml Übernachtskultur werden für 10 min bei 9000 Upm abzentrifugiert und das Pellet in 2 ml Saccharose/Tris-EDTA resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lysozym-Lsg. werden die Proben (Rauhstämmen) für 5 min bei Raumtemperatur oder bei Glattstämmen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Der Zugabe von 2 ml Triton X-Lösung folgt eine 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Ansätze werden dann für 55-60 Sek. in kochendes Wasser gehalten und sofort für 10 min bei 4 °C und 15.000 Upm abzentrifugiert. Dem Überstand wird 1 Vol. Isopropanol zugefügt und die Probe für 30 min in den Gefrierschrank gestellt. Nach dem Abzentrifugieren bei 4 °C 15.000 Upm für 10 min wird das Pellet für 15-20 min im Vakuumschrank getrocknet und in 150 µl TE-Puffer aufgenommen. Die DNA-Präparation wird mit 1 Vol. gepuffertem Phenol (pH 8,0) ausgeschüttelt, in der Eppendorfzentrifuge für 5 min abzentrifugiert und zweimal mit 1 Vol. Äther ausgeschüttelt. Bei einem zu großen Volumen wird die DNA erneut gefällt und in maximal 100 µl gelöst.

2.2.3. Transformation.

Übernachtskultur in NI verdünnen (1:20) und etwa 90 min. bis zu einer OD bei 546 nm von 0,55-0,7 schütteln. Danach alle Schritte in Eis.

Bakterien abzentrifugieren, in 1/2 Vol. Lsg. C resuspendieren und erneut abzentrifugieren. In 1/2 Vol. Lsg.D resuspendieren, 30 min. auf Eis einwirken lassen und abzentrifugieren. In 1/10 Vol. (Ausgangsvolumen) oder weniger Lsg. D sehr vorsichtig resuspendieren, 15 µl/ml DMSO zusetzen, 0,3 ml Portionen in sterile Röhrchen geben, DNA zufügen (Kontrolle: steriles H₂O), 30 min. auf Eis einwirken lassen, 2 min. bei 43,5 °C inkubieren, je Ansatz 3 ml NI zufügen, mindestens 1 Std. bei 37 °C bebrüten (ohne zu schütteln). Danach 0,2 ml pro Agarplatte (mit Antibiotika oder anderem Selektionsmerkmal) ausstreichen.

2.2.4. DNA-Isolation (Chromosom).

Bakterienvorkultur in 10 ml Müller-Hinton Bouillon für 3 Std. in den Wasserbadschüttler. 2 ml der Vorkultur auf 100 ml Müller-Hinton Bouillon über Nacht schütteln lassen. Bakterien bei 8.000 Upm 10 min abzentrifugieren, mit 10 ml TES-Puffer waschen, erneut abzentrifugieren und die Zellen in 15 ml Saccharose-Tris-Lösung aufnehmen. Dem Ansatz werden 2 ml 0,25 M EDTA pH 8,0 und 0,25 ml Lysozymlösung zugefügt und die Bakterien-suspension für 30 min in einem 100 ml Erlenmeyerkolben im 37 °C Wasserbadschüttler inkubiert.

Die mikroskopische Kontrolle im Phasenkontrast soll überwiegend rundliche Zellen zeigen. Dann wird den Bakterien erneut 2 ml 0,25 M EDTA, 5 ml TES, 2,5 ml 10 % SDS und 250 µl Proteinase K zugegeben und der Ansatz für 90 min bei 37 °C im Wasserbadschüttler inkubiert. Das dabei entstehende hochvisköse Lysat wird mit 6,75 ml 5 M NaClO₄ gut gemischt, in eine 1 l Flasche gefüllt und mit 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) gefällt. Dazu wird der Ansatz für 4 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgt durch Zentrifugation bei 3.500 Upm für 15 min. Nach Abheben der wässrigen Phase wird diese mit 2 Vol. eisgekühltem Äthanol überschichtet und die DNA auf einen Glasstab gewickelt. Die DNA wird über Nacht im Vakuum getrocknet und für die Versuche in 2 ml sterilem H₂O gelöst.

2.2.5. Filter-Hybridisierung nach Übertragung des Nukleinsäuremusters auf Nitrozellulose-Filter mit Hilfe der Southern Blot Technik.

Die Übertragung von elektrophoretisch aufgetrennten Nukleinsäuren auf Nitrozellulose-Filter ist nach der Methode von Southern (1975) durchgeführt worden. Als Übertragungspuffer wird 10 x SSC verwendet. Die Vorhybridisierung der vakuumgetrockneten (80 °C, 2 Std.) Filter erfolgt bei 60 °C für mindestens 2 Stunden in 5 x Denhardt mit 3 x SSC, 0,1 % SDS und 100 µg/ml denaturierter Heringssperma-DNA, die Hybridisierung in derselben Lösung unter Zusatz von radioaktiv-markierter und denaturierter DNA bei 68 °C für 16 Stunden. Unspezifisch gebundene DNA wird durch Waschen der

Filter bei Raumtemperatur mit 0,2 x SSC mit 0,1 % SDS und bei 68 °C mit 0,1 x SSC mit 0,1 % SDS entfernt. Die getrockneten Filter werden auf Röntgenfilm mit Verstärkerfolie bei -70 °C für 36 Std. exponiert.

2.2.6. Immunelektrophorese.

Die Immunelektrophorese ist nach Grabar und Williams (1953) durchgeführt worden. Entfettete Objektträger werden mit je 2,5 ml 1 % Agar Noble in VBS-Puffer (ohne CaCl_2 und ohne MgCl_2) beschichtet und für 15-30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Je 10 μl der zu testenden Lösung wird in die ausgestanzten Löcher gegeben, der Objektträger in die mit VBS-Puffer (ohne) gefüllte Elektrophoresekammer gegeben und für 30 min bei 200 V und danach für 60 min bei 100 V aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wird eine Rinne für das Antiserum ausgehoben und entweder mit 50 μl Antiserum oder für den Kapselnachweis mit 150 μl Cetavlon (10 mg/ml) gefüllt und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antigen-Antikörper Reaktion dauert mehr als 16 Std., während bei der Cetavlonfällung bereits nach etwa 2 Std. eine Präzipitation sichtbar wird. Der durch die Antigen-Antikörper-Reaktion entstandene Immunkomplex kann mit Coomassie-Blue angefärbt und die Objektträger danach zur Konservierung getrocknet werden.

2.2.7. K1-Phagentest.

Die K1-spezifischen Bakteriophagen sind uns freundlicherweise von Dr. B. Rowe, Central Public Health Laboratory, London zur Verfügung gestellt worden. Es handelt sich dabei um fünf verschiedene Phagen (Gemski et al., 1980). Für den Test auf Phagensensibilität werden TSA-Platten mit Bakterien einer Flüssigkultur überflutet, die Suspension bleibt für einige Zeit auf den Platten, dann wird der Überstand abpipettiert und die Platten für 30 min im Brutschrank vorinkubiert. 20 μl der verdünnten Phagenlysate (10^6 plaquebildende Einheiten/ml) werden auf die vorbereiteten Agarplatten aufgetropft und die Platten über Nacht bebrütet. Sensibilität kann aufgrund der klaren Hemmhöfe an den Auf-tropfstellen in dem Bakterienrasen abgelesen werden.

2.2.8. Rocketimmunelektrophorese.

Die Rocketimmunelektrophorese ist nach Svendsen et al. (1983) durchgeführt worden. 1 % Agar Noble in Tris-Barbitalpuffer (pH 8,6) wird zum Lösen des Agars aufgekocht und danach auf 45 °C abgekühlt. Zu 10 ml Agar werden 163 μl Anti-Meningokokken B-Serum gegeben (das uns freundlicherweise von Prof. Dr. M. Achtman, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, zur Verfügung gestellt wurde). Der Agar wird sofort auf eine entfettete 5 x 10 cm große Glasplatte gegossen. Nach dem Erkalten werden etwa 1 cm vom unteren Rand entfernt 10 Löcher für Proben ausgestanzt. Als Laufpuffer für die

Elektrophorese ist ebenfalls Tris-Barbitalpuffer verwendet worden. Nach einer etwa 3-4 stündigen Elektrophorese bei 60 mA werden Immunkomplexe sichtbar.

2.2.9. Serumresistenztest.

Die Versuche zur Ermittlung der Serumresistenz sind wie folgt durchgeführt worden. Aus einer Übernachtskultur werden die Bakterien 1:40 in frischem Medium angeimpft und für drei Stunden im Schüttelwasserbad vorinkubiert, um die Kultur in eine logarithmische Wachstumsphase zu bringen. Die Drei-Stunden-Schüttelkultur wird in frische vorgewärmte Müller-Hinton Bouillon (1:100) gegeben und 100 μ l dieser Bakteriensuspension pro Reaktionsansatz verwendet. Die Ausgangskonzentration beträgt bei dieser Methode etwa 1×10^6 Bakterien/ml.

Für die Reaktionsansätze werden zu je 100 μ l Bakteriensuspension die jeweiligen Mengen an frisch aufgetautem NHS gegeben und der Ansatz mit Müller-Hinton Bouillon auf 1 ml aufgefüllt. Die Proben werden danach im Schüttelwasserbad bei 37 °C für drei Stunden inkubiert. In Abständen werden je 100 μ l zur Zellzahlbestimmung entnommen und in physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) in 10er Schritten verdünnt. 800 μ l der drei stärksten Verdünnungen werden auf einer C.L.E.D.-Agarplatte verteilt. Nach Inkubation der Agarplatten für mindestens 15 Stunden im Brutschrank bei 37 °C werden die Kolonien ausgezählt, daraus die Bakterienzahl im Versuchsansatz zum Zeitpunkt der Probenentnahme errechnet und die Ergebnisse grafisch dargestellt.

2.2.10. Immunfluoreszenztest.

Die Bakterien werden aus der Übernachtskultur in frische Müller-Hinton Bouillon (5 ml) überimpft und für 3 Std. im Schüttelwasserbad bei 37 °C vorinkubiert. Danach werden die Bakterien einmal mit vorgewärmtem VBS-Puffer gewaschen, in diesem Puffer aufgenommen und auf eine optische Dichte bei 600 nm von 0,30 eingestellt. Zu 800 μ l dieser Bakteriensuspension wird für den C3-Nachweis 100 μ l und für die Versuche mit Faktor H 50 μ l NHS zugegeben und mit VBS-Puffer auf 1 ml aufgefüllt. Die Ansätze werden erneut für 15 min im Schüttelwasserbad inkubiert. 20 μ l der Versuchsansätze werden auf einen zur besseren Haftung der Bakterien mit Gelatinelösung beschichteten und vorher entfetteten Objektträger aufgetropft. Unter dem Abzug wird die Probe möglichst schnell getrocknet. Die angetrockneten Bakterien werden mit 20 μ l FITC-markiertem Anti-C3b (1:100 in PBS verdünnt) bzw. 20 μ l FITC-markiertem Anti-Faktor H (1:10 in PBS) überschichtet und in einer abgedunkelten feuchten Kammer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach zweimaligem vorsichtigen Spülen mit PBS-Puffer werden die Objektträger erneut getrocknet und die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

Für den Nachweis von C5 ist ein indirekter Test durchgeführt worden. Die auf den Objektträgern angetrockneten Bakterien werden mit Ziege-Anti-Human C5-IgG (1:50 in PBS) und ebenfalls für 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden die Objektträger getrocknet und mit FITC-markiertem Kaninchen-Anti-Ziege IgG-Globulin überschichtet und erneut in der abgedunkelten feuchten Kammer für 40 min inkubiert. Anschließend kann nach zweimaligem Waschen mit PBS und Trocknung der Objektträger eine Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop vorgenommen werden.

2.2.11. Hämolytische Tests zur quantitativen Bestimmung des C3- und C5-Verbrauches.

Für die Versuche müssen sowohl Antikörper als auch eine oder mehrere Komplementkomponenten an Schafserthrozyten angelagert werden. Dazu sind die von Kabat und Mayer (1961) beschriebenen Methoden verwendet worden.

Zur Messung des C3-Verbrauches durch die Bakterien wird aus der Übernachtskultur eine Drei-Stunden-Schüttelkultur in ISO-Sensitest-Bouillon angesetzt, die Bakterien nach der Inkubation mit VBS-Puffer gewaschen und die Bakteriensuspension in VBS auf eine optische Dichte bei 600 nm von 0,60 eingestellt. 900 µl dieser Bakteriensuspension wird mit 100 µl Serum gemischt und erneut im 37 °C Schüttelwasserbad inkubiert. Als Kontrolle dient ein Ansatz ohne Bakterien mit 900 µl VBS-Puffer. Nach der Inkubation werden die Bakterien abzentrifugiert und Verdünnungsreihen der Überstände in VBS-Glucose-Puffer hergestellt. Für den Versuch sind die Verdünnungen 1:100, 1:300 und 1:1000 geeignet. Als Kontrolle dienen die Ansätze CB (cells blank), CBC (cells blank + complement) und 100 % (100 %-ige Lyse).

Die Reagenzien A und B enthalten alle Komplementkomponenten mit Ausnahme der zu testenden Komponente C3 und den bereits an die Erythrozyten gebundene Komponenten C1 und C4. Reagenz A setzt sich aus 1 Vol. C2_{max} (1:10) und 1 Vol. einer Mischung aus gleichen Teilen von C5 (1:10), C6 (1:2) und C7 (1:2) zusammen. Reagenz B besteht aus gleichen Teilen an C8 (1:2) und C9 (1:2).

Die Reaktionsansätze werden entsprechend der Aufstellung zusammenpipettiert (die Zahlenwerte sind in µl angegeben):

	* Proben *	CB	* CBC *	100%
EAC14-Zellen	* 50	* 50	* 50	* 50
VBS-Glucose	* -	* 650	* -	* -
H ₂ O	* -	* -	* -	* 650
Überstandsverdünnung	* 50	* -	* -	* -
Reagenz A	* 50	* -	* 50	* -

Die Ansätze werden für 30 min bei 30 °C inkubiert und anschließend je 50 µl Reagenz B zu den Proben und der Kontrolle CBC gegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 60 min bei 37 °C, werden CBC und die Proben mit VBS-Glucose-Puffer auf 700 µl aufgefüllt und die nicht lysierten Erythrozyten abzentrifugiert. Die Extinktion der Überstände wird bei einer Wellenlänge von 412 nm gemessen, wobei darauf zu achten ist, daß sowohl CB, als auch CBC den Wert von 0,10 nicht überschreiten sollen.

Der C3-Titer wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Titer} = - \ln \left(1 - \frac{E_{\text{Probe}} - E_{\text{CBC}}}{E_{100\%} - E_{\text{CB}}} \right) \times \text{Verdünnung} - 1$$

Die mit unterschiedlichen Verdünnungen eines Überstandes ermittelten Titerwerte werden gemittelt und in Prozent des C3-Titers zu Beginn des Experimentes (Probe ohne Bakterien vor der Inkubation) angegeben.

Für die Messung des C5-Verbrauches durch die Bakterien sind die Versuchsansätze analog zu denen der C3-Bestimmung anzusetzen. Deutliche Verbrauchswerte setzen aber gewisse Änderungen voraus, so daß die optische Dichte der Bakteriensuspension bei 600 nm auf 0,12 eingestellt wird und eine stärkere Verdünnung der Inkubationsüberstände (1:1000, 1:2000 und 1:4000) erfolgen muß. Eine weitere Änderung besteht in der Verwendung von EAC142-Zellen, die in dem System eine geringere spontane Lyse zeigen. Reagenz A setzt sich aus gleichen Teilen C3 (1:4), C6 (1:4) und C7 (1:10) zusammen, Reagenz B enthält C8 (1:4) und C9 (1:4) im Verhältnis 1:1. Die Versuchsdurchführung und Berechnung erfolgt ansonsten wie bei dem C3-Verbrauchstest.

2.2.12. Radioaktive Markierung von Komplement-Komponenten.

Die radioaktive Markierung der Komplementkomponenten ist nach der von Fraker und Speck (1978) beschriebenen Methode durchgeführt worden. 100 µl der zu markierenden Komplementkomponente werden zusammen mit 5 µl ^{125}J (- 0,25 mCi) in ein vorbereitetes Iodogen-Röhrchen gegeben und für 30 min im Eis inkubiert. Während dieser Zeit wird das Röhrchen alle 5 min vorsichtig geschüttelt. Danach wird der Ansatz auf eine zweimal für 2 min bei 1.000 UpM zentrifugierte P-6 Säule geschichtet, mit 50 µl VBS (ohne CaCl_2 und MgCl_2) gespült und die Säule erneut für 2 min bei 1.000 UpM zentrifugiert. Das ungebundene ^{125}J bleibt an dem Säulenmaterial hängen. Aus der Probe werden 5 µl zur Aktivitätsbestimmung entnommen.

2.2.13. Nachweis der Anlagerung von radioaktiv-markierten Komplementkomponenten an Bakterien.

Aus der Übernachtskultur werden 30 μ l in 1,1 ml Müller-Hinton Bouillon gegeben und für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. 1 ml der Bakterienkultur wird bei 3.000 UpM für 5 min abzentrifugiert und zu dem Pellet werden 300 μ l NHS + radioaktiv markierte Komplementkomponente gegeben. Der Ansatz wird für 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 100 μ l des Reaktionsansatzes werden auf 300 μ l 10 % Saccharose/Ovalbumin gegeben und zentrifugiert. Das Bakterienpellet in der Spitze des Reaktionsgefäßes wird mit Hilfe einer Rasierklinge vom Überstand getrennt und die Radioaktivität beider Proben wird gemessen.

2.2.14. Saccharose-Dichte-Gradienten Zentrifugation des inkubierten Serums.

Die Analyse des Serumüberstandes ist nach der Methode von Harriman et al. (1982) durchgeführt worden. Dazu werden die Reaktionsansätze (mit oder ohne radioaktiv-markierte Komplementkomponente) nach Inkubation mit Bakterien abzentrifugiert und 100 μ l des Überstandes vorsichtig auf einen linearen Saccharose-Dichte-Gradienten (10 - 40 % Saccharose in VBS) geschichtet und die Proben für 16 Stunden bei 4 °C und 28.000 UpM zentrifugiert. Die Ansätze werden dann fraktioniert und die Fraktionen in einem Gamma-Szintillations-Spektrometer gezählt. In Ansätzen ohne eine radioaktiv-markierte Komplementkomponenten werden die Fraktionen bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Die jeweiligen Ergebnisse sind grafisch dargestellt.

2.2.15. CH_{20} und alternativer CH_{50} .

Aus der Übernachtskultur wird eine 3-Stunden-Schüttelkultur angelegt. Die Bakterien werden durch Zentrifugation vom Nährmedium getrennt und mit 1 ml NHS für 30 min im Schüttelwasserbad inkubiert. Der abzentrifugierte Überstand wird in verschiedenen Verdünnungen für die Tests eingesetzt.

Der Reaktionsansatz für den CH_{20} setzt sich wie folgt zusammen:

200 μ l Serumverdünnung (1:10,20,40)

200 μ l EA-Zellen (5×10^6) in VBS-S

1,1 ml VBS

für 60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubieren. Nach 30 min die Ansätze schütteln, nach der Inkubation abzentrifugieren und die optische Dichte bei 541 nm messen.

Der Reaktionsansatz für den alternativen CH_{20} wird wie folgt verwendet:

200 μl Serumverdünnung (1:2,5,10,20)

200 μl Kaninchenerythrozyten (5×10^8) in Mg-EGTA-Puffer für 60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubieren, schütteln, abzentrifugieren und ebenfalls bei 541 nm messen.

Für beide Ansätze werden als Kontrolle die Werte von CB und 100 % verwendet.

2.2.16. Messung der C4-Aktivität.

Aus der Übernachtskultur wird eine 3-Stunden-Schüttelkultur angelegt, die Bakterien abzentrifugiert und mit 500 μl NHS für 15 min im Schüttelwasserbad inkubiert. Der Serumüberstand wird auf seine C4-Restaktivität untersucht, indem 100 μl Serumverdünnung (1:50.000, 100.000, 200.000) zu 100 μl EAC1-Zellen ($1,3 \times 10^8$) gefügt und dieser Ansatz für 15 min bei 30 °C inkubiert wird. Danach werden 100 μl C2 zugegeben und für weitere 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Meerschweinchen-serum-EDTA (1:33) und Überführung der Probe in 37 °C inkubiert der Ansatz für 60 min. Nach dem Abzentrifugieren wird die optische Dichte bei 412 nm gemessen. Der Titer wird nach der unter 2.2.10. beschriebenen Formel errechnet und mit der Zellzahl (EAC1) multipliziert, woraus sich die Zahl der effektiven Moleküle/ml ergibt. Die ermittelten Werte für die Serumüberstände werden in Prozenten einer inkubierten Serumprobe ohne Bakterien angegeben. Als Kontrolle innerhalb des Experimentes sind die Ansätze CB, CBC und 100 % verwendet worden.

2.2.17. SDS-Page (Polyacrylamid-Gelelektrophorese).

Für die Proteinauftrennung der äußeren Membranen ist ein 11 %iges, für die Darstellung des MAC ein 7,5 %iges Trenngel verwendet worden. Die Gele setzen sich wie folgt zusammen:

	11 %		7,5 %
0,75 M Tris-HCl pH 8,8	14,00	ml	14,00 ml
10 % SDS	0,56	ml	0,56 ml
H ₂ O bidest	5,50	ml	8,00 ml
Stock Lösung I	7,00	ml	4,70 ml
Ammoniumpersulfat	0,71	ml	0,71 ml
TEMED	0,056	ml	0,056 ml

Das Sammelgel besteht in beiden Fällen aus:

0,25 M Tris-HCl pH 6,8	5,00	ml
10 % SDS	0,10	ml
H ₂ O bidest	3,50	ml
Stock Lösung II	1,00	ml
Ammoniumpersulfat	0,25	ml
TEMED	0,020	ml

Die Gelkammer wird mit Elektrophoresepuffer gefüllt und mit zwei Gelen bestückt. Nach dem Auftragen der Proben, die vorher für 5 min in Proben-Puffer gekocht worden sind, werden die Proteine für etwa 4 Stunden mit 55 mA aufgetrennt. Anschließend werden die Gele für 20 min in Färbelösung und danach in Entfärbelösung gelegt, um die aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen.

2.2.18. Blotting.

Die Übertragung der Proteinmuster vom Polyacrylamid-Gel auf Nitrozellulose-Filter ist nach der Methode von Towbin et al. (1979) durchgeführt worden. Dazu werden die Proteine aus dem Gel durch Elektrophorese in einer Transblot-Kammer in Blotting Puffer bei 0 °C im Eisbad erst für 15 min mit 100 mA, danach für 2 Stunden mit 299 mA auf den Filter übertragen.

2.2.19. Entwicklung eines Blots.

Zum Antikörper-Nachweis auf Nitrozellulose-Filter ist die Methode von Hawkes et al. (1982) angewendet worden. Bei der Entwicklung des Immunoblots werden zuerst die unspezifischen Bindungsstellen durch einstündige Inkubation in TBS-Puffer mit 0,1 % Tween 20 auf einem Schüttler bei Raumtemperatur abgesättigt. Danach wird der Filter in TBS gewaschen und mit dem 1. Antikörper für 1,5 Stunden inkubiert. Zur Entfernung des Antikörpers wird der Filter im Anschluß daran dreimal für 5 min mit TBS gewaschen und erneut für 1,5 Stunden mit dem 2. Antikörper inkubiert. Die Antiseren werden je nach ihrer Konzentration 1:100 oder stärker in TBS mit 0,05 % Tween 20 verdünnt. Auch zur Entfernung des 2. Antikörpers wird der Filter dreimal für 5 min in TBS gewaschen und anschließend für 10 min mit Substratlösung inkubiert. Das abschließende Wässern dauert mindestens 10 min.

2.2.20. Ouchterlony.

Die Antigen-Antikörper-Reaktion ist mit Hilfe der Doppeldiffusions-Technik nach Ouchterlony nachgewiesen worden. Anstelle des Zentralloches ist eine Rinne mit dem Antiserum gefüllt worden.

2.2.21. Silberfärbung.

Zur Silberfärbung wird das Polyacrylamid-Gel über Nacht in Isopropanol-Essigsäure (2,5 :1) gelegt und danach für 30 min in 7,5 % Essigsäure. Es folgt eine 1 stündige Inkubation in 0,2 % Perjodsäure bei 4 °C. Das Gel wird dann für 3 Stunden in eiskaltem Aqua bidest. gewaschen (8-9 mal frisches Wasser). Die weiteren Schritte sind nun schematisch dargestellt:

2 min in Lösung 4
 2 min in Aqua bidest.
 2 min in Lösung 6 mit Methanol (10 ml Methanol und 90 ml Lösung 6)
 1 min in Aqua bidest.
 2 min in Lösung 4
 1 min in Aqua bidest.
 in Lösung 6 bis die Banden sichtbar werden, dann mit fotografischem Fixierer die Reaktion stoppen und die Silberfärbung fixieren.

2.2.22. Proteingehaltsbestimmung.

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Proben ist nach der Methode von Markwell et al. (1978) durchgeführt worden. Zu 300 μ l der zu testenden Probe wird 1 ml Reagenz C (15 ml Lsg. A und 150 μ l Lsg.B) zugegeben und der Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der anschließenden Zugabe von 100 μ l Reagenz D (Folin-reagenz und Aqua bidest. 1:1) werden die Ansätze sorgfältig gemischt und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der optischen Dichte erfolgt bei 660 nm. Die Proteinkonzentration wird anhand der Eichgeraden (1 mg/ml BSA als Standard) ermittelt.

2.2.23. KDO-Bestimmung.

Die Konzentration an KDO wird wie folgt bestimmt:

400 μ l Probe werden mit 100 μ l 1 N H_2SO_4 für 30 min gekocht und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit 0,25 ml Perjodsäurelösung gemischt und der Ansatz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es werden danach 0,25 ml Na-Arsenit-Lösung und 0,5 ml Thiobarbitolsäurelösung zugefügt und die Probe erneut für 15 min gekocht. In die heiße Lösung wird 1 ml DMSO gegeben und die optische Dichte bei 548 nm gemessen. Als Standard dient eine KDO-Lösung mit einer Konzentration von 10 μ g/ml.

2.2.24. Neuraminsäurebestimmung.

Der Gehalt an Neuraminsäure ist mit der von Barry et al. (1962) beschriebenen Methode ermittelt worden. Zu 350 μ l Probe werden 700 μ l Reagenz A gegeben, der Ansatz geschüttelt, 350 μ l Ehrlichs Reagenz zugefügt und die Probe für 30 min gekocht. Zur schnellen Abkühlung auf Raumtemperatur werden die Ansätze in ein Eisbad gegeben und die optische Dichte bei 530 nm gemessen. Die Werte werden aufgrund einer Eichgeraden errechnet.

2.2.25. Berechnungen.

Die Zahlenwerte für die einzelnen Stämme stellen jeweils den Mittelwert von wenigstens drei unabhängigen Versuchen dar. Die Werte aller Stämme einer Gruppe sind ebenfalls gemittelt und die Standardabweichungen berechnet worden. Um zu überprüfen, ob die festgestellten Unterschiede signifikant sind, sind die Mittelwerte der beiden Stichproben mit dem t-Test ("Student") verglichen worden.

3. Ergebnisse

Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten sind entsprechend der verwendeten Stämme, Wildstämme und ihre Mutanten einerseits und Blutkulturstämme andererseits, sowie der abweichenden Fragestellung in zwei Abschnitte gegliedert. Dabei wird im ersten Teil der Mechanismus der Serumresistenz durch Freisetzung des MAC anhand von homologen Pärchen untersucht, im zweiten Teil die Mechanismen der Serumresistenz insbesondere die unterschiedliche Komplementaktivierung und seine molekulare Grundlage beschrieben.

3.1. Untersuchung des Mechanismus der Serumresistenz durch Freisetzung des MAC

3.1.1. Herkunft und Charakterisierung der verwendeten Mutanten.

Durch Konjugation der Stämme Wf8, Wf26 und Wf52 mit W3110 K12 R6K konnten Mutanten (Transkonjuganten) erhalten werden, die eine stark verminderte Serumresistenz im Gegensatz zu den Wildstämmen aufweisen. Die Konjugationsrate bei diesen Experimenten betrug 10^{-10} . Das übertragene Plasmid R6K kodiert mehrere Antibiotikaresistenzen und konnte in DNA Isolationen der Mutanten (Transkonjuganten) auf Agarose-Gelen nachgewiesen werden. Ein Vergleich der Plasmidmuster von Wf8 und den Mutanten (Transkonjuganten) Wf8 R6K und Wf8/2 R6K zeigte, daß der Wildstamm zwei kleine Plasmide besitzt (7,8 und 4.0 MDal), die nicht mit dem Plasmid R6K kom-

patibel sind und daher bei der Konjugation verloren-
gingen. Ein Verlust von Plasmiden konnte für die anderen
Stämme (Wf26 und Wf52) nicht festgestellt werden; bei
den Transkonjuganten war R6K aufgenommen worden.

Zwei der für die Konjugationen verwendeten Wildstämme
(Wf8 und Wf26) können Hämolyisin bilden und durch die
äußere Membran transportieren (sezernieren, α -hämoly-
tisch), während ihre Mutanten (Transkonjuganten) nicht
mehr in der Lage sind auf Blutagar Hemmhöfe um die
Kolonien zu bilden.

Die Fähigkeit Hämolyisin in das umgebende Medium abzu-
sondern, wird durch plasmidale oder chromosomale Gen-
sequenzen kodiert. In beiden Fällen sind dazu vier Gene
(hlyC, hlyA, hlyB_A und hlyB_B) erforderlich (Noegel et
al., 1979, Härtlein et al., 1983, Wagner et al., 1983).
Zur genetischen Untersuchung der Mutanten (Transkon-
juganten) konnten die am Institut für Genetik und Mikro-
biologie der Universität Würzburg unter Leitung von
Herrn Prof. Dr. W. Goebel erstellten Vektoren verwendet
werden. In den Versuchen wurde restringierte chromo-
somale Bakterien-DNA in einem Agarose-Gel aufgetrennt
und das Fragment-Muster mit Hilfe der `Southern blot
technique` auf einen Nitrozellulosefilter übertragen.
Zur Hybridisierung wurden die Filter mit Hämolyisin-Gen-
spezifischen, radioaktiv-markierten Vektoren inkubiert
und danach die Anlagerung von komplementären DNA-Sequen-
zen durch Exposition der Filter auf Röntgenfilm sichtbar

gemacht. Es gelang zu zeigen, daß die Mutanten (Transkonjuganten) Wf8 R6K, Wf8/2 R6K, Wf26/7 R6K und Wf26/9 R6K nicht mehr die vollständigen Hämolyzingene enthalten. Bei den Hybridisierungsexperimenten kam es zur Bindung des Vektors pAn505 (hly_E-Gen einschließlich flankierender Regionen) an restringierte DNA der Wildtypen Wf8 und Wf26, während im Gegensatz dazu in der restringierten Mutanten- (Transkonjuganten-) DNA keine homologen Sequenzen nachweisbar waren. Die Mutanten (Transkonjuganten) unterscheiden sich also nicht nur durch das bei der Konjugation aufgenommene Plasmid R6K vom Ausgangsstamm, sondern auch durch eine Deletionsmutation auf dem Chromosom vom Wildtyp. Aus diesem Grunde wurden die Stämme in der vorliegenden Arbeit stets als Mutanten bezeichnet, insbesondere weil die Mutation in Zusammenhang mit der verminderten Serumresistenz gesehen werden kann. Hybridisierungsexperimente wurden nicht mit dem Stamm Wf52 und seiner Transkonjugante durchgeführt, weil keine hämolytische Aktivität des Wildstammes nachzuweisen ist.

Sowohl der Stamm Wf8, als auch Wf26 besitzen eine K13 Kapsel. Untersuchungen des Kapselmaterials ergaben, daß die Kapsel der Mutante im Vergleich zu der des Wildtypes verändert ist. In der Immunelektrophorese wanderte das isolierte Kapselmaterial der Mutante weiter zum positiven Pol hin, besitzt also eine veränderte Ladung. Es konnte auch gezeigt werden, daß die Mutante wesentlich mehr Kapselmaterial produziert als der Wildtyp (Abb.1).

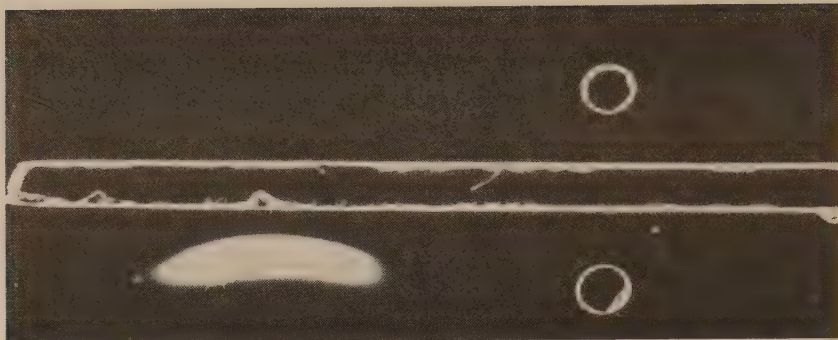


Abb. 1. Immunelektrophoretische Auftrennung des Kapselmateriales der Stämme Wf8 (A) und Wf8/2 R6K (B). Kathode rechts.

3.1.2. Genetische Experimente mit den Wildtypen und ihren Mutanten.

Die Wildtypen und ihre Mutanten wurden auch auf den Besitz von Plasmiden untersucht. Aus dem Wildstamm Wf8 konnten zwei kleine Plasmide (4,8 und 6,8 MDal) und aus dem Stamm Wf52 vier Plasmide (2,2/2,9/4,8 und 7,4 MDal) isoliert werden. Der Stamm W26 besitzt keine Plasmide. Nach der Konjugation mit dem Plasmid R6K konnten in den Mutanten (Transkonjuganten) Wf8 R6K und Wf8/2 R6K die beiden kleinen Plasmide nicht mehr nachgewiesen werden.

Der Verlust der beiden Plasmide bei der Konjugation des Plasmids R6K in den Wildtyp Wf8 oder der Besitz des Plasmids R6K konnten neben der Mutation im Bereich des hly-Genes in direktem Zusammenhang mit der gesteigerten

Serumsensibilität stehen. Aus diesem Grunde wurden die nachfolgenden Experimente durchgeführt.

Um einen Einfluß der beiden kleinen Plasmide, deren Funktion unbekannt ist, auszuschließen, wurde jedes mit einem unterschiedlichen Transposon markiert (Tn3 und Tn5) und einzeln oder gemeinsam in serum-sensible Laborstämme von E.coli transformiert. Es kam dabei nicht zu einer Steigerung der Serumresistenz (Kubens und Opferkuch, Manuskript in Vorbereitung). In den Versuchen war die Lage des Transposons auf dem Plasmid durch Restriktionsanalyse überprüft worden. In Parallelversuchen wurden Plasmide mit unterschiedlichen Insertionsstellen der Transposons verwendet, um eine Inaktivierung eines für die Ausprägung der Serumresistenz notwendigen Gens durch die Markierung auszuschließen. Ähnliches gilt auch für die Transformation beider Plasmide in einen serum-sensiblen Laborstamm. Der Verlust der Plasmide kann folglich nicht als Ursache für die markante Reduktion der Serumresistenz gesehen werden.

Ein Einfluß des Plasmids R6K auf die verminderte Serumresistenz wurde durch den Vergleich von R6K-tragenden Mutanten mit Stämmen in denen das Plasmid eliminiert war, ausgeschlossen. Das Curing eines Stammes von dem Plasmid R6K erweist sich als sehr schwierig, weil etwa 21 Kopien dieser extrachromosomalen Gensequenz in einem Bakterium vorliegen. Mit Hilfe von subinhibi-

torischen Konzentrationen von Proflavin und durch 30 maliges Überimpfen des Stammes (Attfield und Pinney, 1985), konnten einige plasmidfreie Klone isoliert werden. Die Serumresistenz dieser Isolate liegt ebenso niedrig wie bei der Mutante Wf8/2 R6K.

Der Verlust der Serumresistenz Eigenschaft muß also auf die Mutation im Bereich des Hly-Genes zurückgeführt werden.

3.1.3. Auftrennung des Protein- und des LPS-Musters der äußeren Membran von Wildtypen und ihren Mutanten im Polyacrylamid-Gel.

Um zu überprüfen, ob die durch die Mutation entstandenen genetischen Unterschiede zwischen den Wildtypen und ihren Mutanten in der äußeren Membran sichtbar werden, wurde das Proteinstück auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Bakterienoberfläche stellt den Angriffspunkt für das Komplementsystem dar und die verminderte Serumresistenz gab einen zusätzlichen Hinweis auf eine derartige Veränderung.

Die Unterschiede zwischen dem Proteinstück des jeweiligen Wildstammes und dem der Mutanten waren nur geringfügig (Abb. 2). Unterschiede in den Hauptproteinen der äußeren Membran waren nicht festzustellen, während einige hochmolekulare Proteine mengenmäßig verändert erschienen. Ein Vergleich des LPS-Musters zeigte, daß die Mutanten einen Teil der langkettigen Polysaccharidketten verloren haben, also nicht mehr als Glattstämme, sondern als semi-Rauhstämme anzusehen sind.

Der Verlust der langkettigen Polysaccharidseitenketten dokumentiert eine wesentliche Veränderung in der Struktur der äußeren Membran. Dieses Ergebnis konnte im Ganzzell-ELISA nicht bestätigt werden. Hier reagierten sowohl der Wildstamm Wf8 als auch seine Mutanten Wf8 R6K und Wf8/2 R6K mit O6-Antiserum.

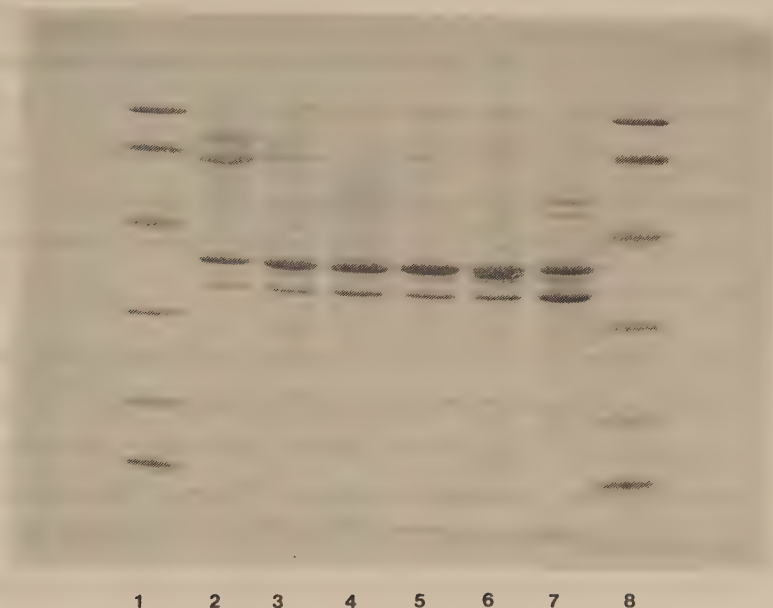


Abb. 2. Protein-Muster der äußeren Membran von Wf8 (7), Wf8/2 R6K (6), Wf8 R6K (5), Wf26 (4), Wf26/5 R6K (3) und Wf26/7 R6K (2). Als Standard wurde ein Molekulargewichtsmarker (Pharmacia) (1 + 8) verwendet.

3.1.4. Definition der Serumresistenz.

Der Begriff Serumresistenz besitzt keine allgemeingültige Definition. In der hier vorliegenden Arbeit

erfolgte die Bewertung der getesteten Stämme in Bezug auf ihre Resistenzeigenschaften stets unter Angabe der in dem Experiment verwendeten Serumkonzentration.

Der Bewertung liegen folgende Kriterien zugrunde:

Ein Stamm wurde als "serumresistent" bezeichnet, wenn die Zahl der cfu (koloniebildenden Einheiten) bei der Inkubation in der angegebenen Serumkonzentration innerhalb von drei Stunden zu keiner Zeit unter 10% des Ausgangswertes abgesunken war und spätestens nach drei Stunden dieser Wert wieder erreicht wurde. In den meisten Fällen kam es allerdings nach einem anfänglichen geringen Abfall der Zellzahl zu einer starken Vermehrung der cfu.

Als "serumsensibel" wurde ein Stamm bezeichnet, bei dem nach drei Stunden Inkubation in der angegebenen Serumkonzentration weniger als 10% der Bakterien zum Zeitpunkt 0 Min. nachzuweisen waren. Diese Stämme zeigten meist ein sehr charakteristisches Bild, indem die Zellzahl schon innerhalb der ersten Stunde um mindestens zwei log-Stufen absank und auch im Falle einer späteren Vermehrung der geforderte Wert nicht mehr erreicht wurde.

Bei den hier untersuchten E.coli Stämmen, wurde kein sogenannter "Intermediate-Stamm" gefunden, der ein Wachstumsverhalten aufwies, das sich nicht in die hier beschriebenen Kategorien einordnen ließ.

3.1.5. Serumresistenz der Wildtypen und ihrer Mutanten.

Die Wf-Stämme sind im Gegensatz zu ihren Mutanten serumresistent. Die großen Unterschiede im Resistenzverhalten bei Inkubation in NHS zwischen Wildtypen und Mutanten sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Die Wildtypen besitzen eine mehr oder minder starke Resistenz gegen die bakterizide Wirkung des Serums, während die Mutanten diesen Abwehrmechanismus verloren haben.

Stamm	*	Serumkonzentration	*	Bewertung
	*	im Versuchsansatz	*	
	*	in Prozent	*	
Wf 8	*	90	*	resistent
Wf 8 R6K	*	3	*	sensibel
Wf 8/2 R6K	*	3	*	sensibel
Wf 26	*	25	*	resistent
Wf 26/7 R6K	*	3	*	sensibel
Wf 26/9 R6K	*	3	*	sensibel
Wf 52	*	20	*	resistent
Wf 52 R6K	*	3	*	sensibel

Tabelle 1. Serumresistenz der Wf-Stämme und ihrer Mutanten gegen NHS.

3.1.6. Serumresistenz bei unterschiedlichen Serumspezies.

Die serum-sensiblen Mutanten wurden nicht nur in NHS auf ihre Serumresistenz getestet, sondern auch mit Kaninchen- bzw. Meerschweinchenserum inkubiert. Typische Verläufe der Wachstumskurven und der Einfluß verschiedener Serumspezies auf den serumsensiblen Stamm Wf 26/7 R6K sind in Abb. 3 dargestellt.

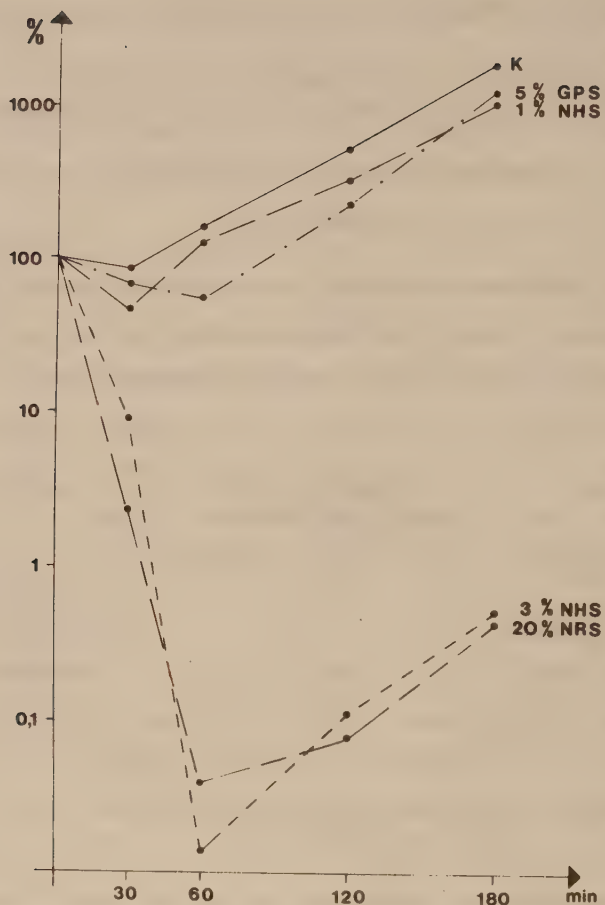


Abb. 3. Wachstumskurven von Wf 26/7 R6K bei Inkubation in verschiedenen Serumspezies. NHS= normales Humanserum, GPS= Meerschweinchen-serum, NRS= Kaninchenserum

Die bakterizide Wirkung der verschiedenen Serumspezies auf den serumsensiblen Stamm WF 26/7 R6K kann deutlich erkannt werden. In NHS kam es bereits bei einer Serum-

konzentration von nur 3% zu einer Abtötung, während erst 20% Kaninchenserum zu einem vergleichbaren Ergebnis führten. Die abtötende Wirkung des Meerschweinchensserums war ebenfalls geringer als die des NHS; 5% Meerschweinchenserum konnten keine Reduktion der cfu herbeiführen.

3.1.7. Unterschiedliche Ausprägung der Serumresistenz bei Ausschaltung des klassischen Reaktionsweges.

Die Abtötung der verwendeten Mutantenstämme durch NHS erfolgt teilweise über den klassischen und teilweise über den alternativen Reaktionsweg der Komplementaktivierung. In Versuchen unter Zugabe von EGTA und Mg^{++} , in denen die Aktivierung des klassischen Reaktionsweges nicht mehr möglich ist, konnte z.B. bei dem Stamm Wf 26/7 R6K bei Inkubation in 3% NHS nach 1 Std. keine Reduktion der cfu (129%) festgestellt werden, während im Gegensatz dazu in einem Parallelversuch ohne EGTA unter identischen Bedingungen die Zahl der cfu zu dem Zeitpunkt auf 0,014% abgesunken war. Höhere Serumkonzentrationen führten auch bei EGTA-Zugabe zur Abtötung der Bakterien. Ein unspezifischer Einfluß des Kalziumchelators auf die Bakterien konnte durch entsprechende Kontrollen ausgeschlossen werden.

3.1.8. Serumresistenz bei Inkubation mit Mangelseren.

Um festzustellen, ob die bakterizide Wirkung des Serums tatsächlich auf das Komplementsystem zurückzuführen ist und welche Komplementkomponenten für eine Abtötung unerlässlich sind, wurden Versuche mit Mangelseren

durchgeführt. Die Ergebnisse für den Stamm Wf8/2 R6K sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

% cfu nach 60 min. Inkubation in 10%
des entsprechenden Serums bezogen auf
den Ausgangswert 0 min. = 100 %

Kontrolle	378
NHS	0,25
C2 depl. Serum	222
B depl. Serum	14
C6 depl. Serum	183
C8 depl. Serum	152
C9 depl. Serum	5

Tabelle 2. Einfluß verschiedener Mangelseren auf die Abtötung von Wf8/2 R6K.

Jedem der verwendeten Mangelseren wurde stets 1/2 physiologische Konzentration an C1q zugesetzt, um die durch die Depletierung erfolgte C1 Inaktivierung auszugleichen. Als Kontrolle dienten Parallelansätze in denen ebenfalls Mangelseren verwendet wurden, die depletierte Komponente aber in physiologischer Konzentration zugefügt wurde. Die Komplementierung des Serums führte zu der erwarteten Rekonstitution der bakteriziden Wirkung.

In Vorversuchen mit 5% C6-depletiertem Serum und 1/2 physiologischer Konzentration C6 kam es nach 1 Std. nur zu einer Reduktion der cfu auf 4% des Ausgangswertes während völlige Rekonstitution zu einem Absinken auf nur 0,01% führte.

C9 scheint für die Abtötung des Stammes Wf 8/2 R6K nicht erforderlich zu sein, die Anwesenheit dieser Komponente steigert aber die Effektivität. In 3% NHS erfolgt eine Reduktion der cfu auf weniger als 0,1 % innerhalb einer

Stunde, während es in C9 depletiertem Serum unter gleichen Bedingungen zu einem Ansteigen der cfu auf 121% kam. Weder 5% noch 10% des C9-depletierten Serums führten zu einer vergleichbaren Abtötung (111 bzw. 13,6%), erst bei Zugabe von 25% sinkt die Zahl der cfu auf 0,18%.

3.1.9. Anlagerung von radioaktiv-markierten Komplementkomponenten an einen Wildtyp und seine Mutante.

Bindungsstudien über die Anlagerung verschiedener Komplementkomponenten wurden sowohl mit dem Wildstamm Wf8 als auch mit seiner Mutante Wf8/2 R6k durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 zusammengefaßt.

Serum	*	C6	*	C7	*	C8	*	C9
Normales Humanserum	*	5	*	6	*	4	*	13
C8-Mangelserum	*	1	*	-	*	-	*	-
C9-Mangelserum	*	6	*	-	*	-	*	-

Tabelle 3. Spezifische Bindung einzelner Komplementkomponenten an den Wildtyp Wf8 und seine Mutante Wf8/2 R6K.

Die Zahlenwerte repräsentieren das Verhältnis der spezifischen Bindung der Komponente an die Mutante zur spezifischen Bindung der Komponente an den Wildtyp. Der Wert 1 bei der C6-Bindung in C8-Mangelserum spiegelt das Verhältnis 1:1 wider und dokumentiert keinesfalls eine reduzierte Bindung.

Die Mutante band im Vergleich zum Wildtyp wesentlich mehr Moleküle der Komplementkomponenten C6, C7 und C8; der Faktor dieser gesteigerten Anlagerung wich aber bei

den drei Komponenten nur unwesentlich voneinander ab (4-6). Ein wesentlich größerer Unterschied wurde für C9 festgestellt, die Mutante band die 13-fache Menge dieser Komponente. In C8-Mangelserum wurde an beide Stämme (Wildtyp und Mutante) die gleiche Menge C6 gebunden. Ein mengenmäßiger Unterschied bei der C6-Anlagerung trat erstmals bei der Verwendung von C9-Mangelserum auf.

3.1.10. Nachweis des abdissoziierten MAC.

Die deutlichen Unterschiede in Hinsicht auf die Bindung der terminalen Komplementkomponenten zwischen dem Wildtyp und der Mutante wurden durch Auftrennung der Bestandteile des Serumüberstandes nach ihrem Molekulargewicht untersucht. Das mit den Bakterien inkubierte Serum, dem eine radioaktiv-markierte Komponente zugefügt worden war, wurde über einen linearen Saccharose-Dichte-Gradienten bis zur Einstellung des Gleichgewichtes ultrazentrifugiert und anschließend fraktioniert. Die Ergebnisse der Radioaktivitätsmessungen in den Fraktionen sind in Abb. 4 graphisch dargestellt.

In den Fraktionen 4-11 (erster peak) war die hohe Radioaktivität auf freies ungebundenes C9 zurückzuführen, während die Fraktionen 18-24 (zweiter peak) aufgrund ihrer Lage im Gradienten einen hochmolekularen Komplex darstellten. Die Kontrolle (Inulinaktiviertes Serum) wies in nahezu den gleichen Fraktionen ebenfalls hohe Radioaktivität auf. Dieser Versuch wurde sowohl mit radioaktiv-markiertem C9, als auch mit C6 durchgeführt.

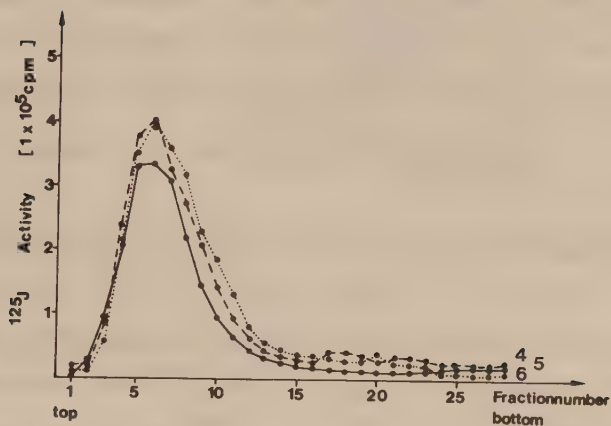
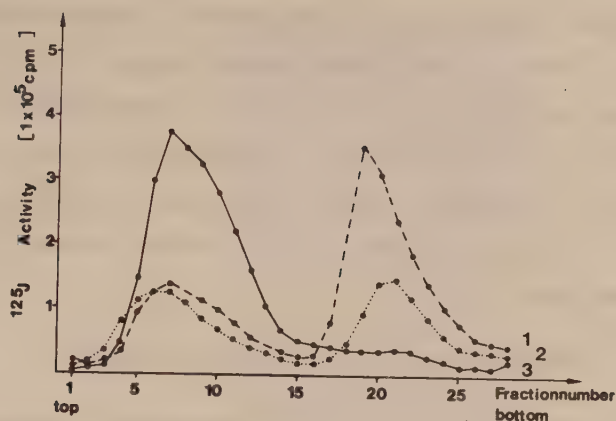


Abb. 4. Saccharose-Dichte-Gradienten Analyse von ^{125}J -C9 im Überstand von Reaktionsansätzen.

Wf8	+ NHS	+ C9* (1)
Wf8	+ hitzeinakt. NHS	+ C9* (3)
Inulin	+ NHS	+ C9* (2)
Wf8 R6K	+ NHS	+ C9* (4)
Wf8 R6K	+ hitzeinakt. NHS	+ C9* (5)
Inulin	+ hitzeinakt. NHS	+ C9* (6)

Die beiden zur Markierung verwendeten Komplementkomponenten banden an dem beschriebenen Komplex, der sich also wie der MAC aus den terminalen Komponenten zusammensetzt und deshalb auch so bezeichnet wurde. Der durch die Zymosanaktivierung entstandene Komplex ist aufgrund seiner Zusammensetzung als SC5b-9 Komplex beschrieben worden.

3.1.11. Untersuchungen des abdissoziierten MAC.

Der aus den terminalen Komplementkomponenten bestehende abdissoziierte Komplex wurde zur näheren Charakterisierung ohne radioaktiv-markierte Komponenten anhand seiner Lage im Gradienten aus Serumüberständen isoliert.

3.1.11.1. Auftrennung der einzelnen Komponenten im Acrylamid-Gel.

Um sicherzustellen, daß der Komplex alle Komponenten enthält, wurde er auf einem 7,5%igen Polyacrylamid-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen (Probenpuffer ohne Mercaptoäthanol) aufgetrennt und anschließend gefärbt. Das Proteinmuster ist in Abb. 5 zu sehen.

Die Proteine wurden aufgrund ihrer Lage im Gel und dem Vergleich mit den von Kolb und Müller-Eberhard (1975) und Bhakdi und Tranum-Jensen (1982a) veröffentlichten Ergebnissen beschriftet.

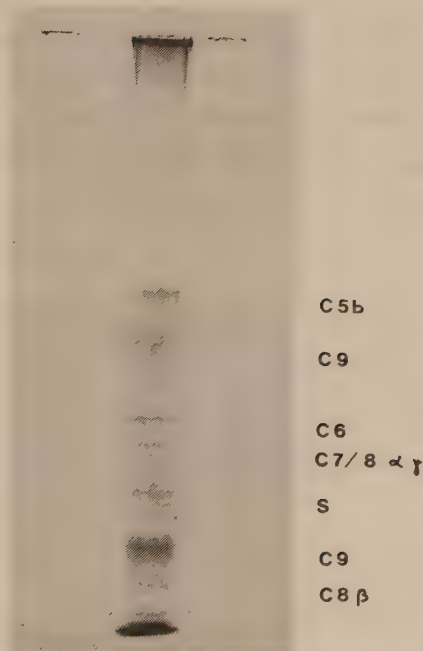


Abb. 5. Proteinmuster eines aus dem Serumüberstand nach Inkubation mit Wf8 isolierten hochmolekularen Komplexes (MAC).

3.1.11.2. Nachweis der Komponente C9 in monomerer und polymerer Form.

Nach dem Auftrennen des Komplexes in die einzelnen Komponenten wurde das Proteinmuster des Gels mit Hilfe der Blot-Technik auf Nitrozellulose übertragen und der Blot dann mit C9 entwickelt. Die Anfärbung einzelner Banden wies darauf hin, daß C9 sowohl in monomerer Form (deutliche Bande im unteren Gelbereich) als auch polymerisiert vorlag. Der Grad der Polymerisation (Nachweis im höhermolekularen oberen Bereich des Gels) schien gering zu sein (Abb. 6).

3.1.11.3. Nachweis des S-Proteins im abdissoziierten MAC.

Die Anwesenheit des S-Proteins im abdissoziierten Komplex konnte auf zwei verschiedene Arten nachgewiesen werden.

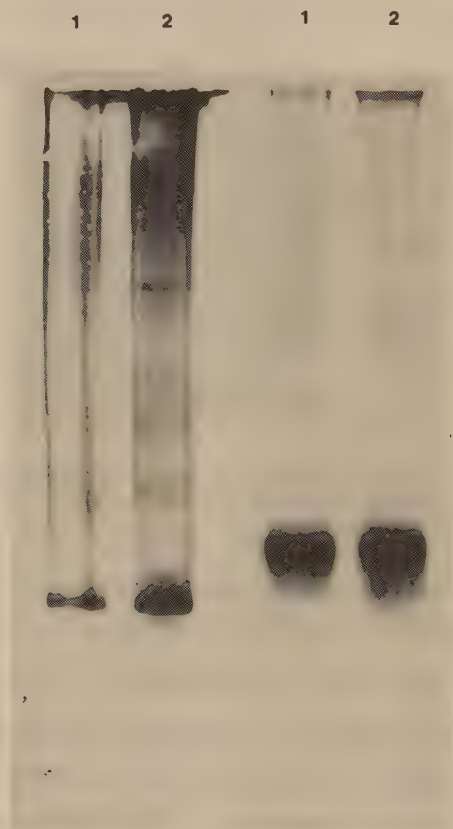


Abb. 6. Nachweis von C9 in einem durch Zymosanaktivierung entstandenen MAC (1) und in einem von Wf8 abdissoziierten Komplex (2) mit Hilfe der Immunoblot-Technik auf Nitrozellulose (A), sowie der Nachweis des S-Proteins in denselben Komplexen (B).

Proben eines mit radioaktiv-markiertem C9 ergänzten Serums wurden mit Hilfe der Ouchterlony Technik mit anti-S-Protein-Serum entwickelt. Die Fraktionen, bei denen eine Reaktion sichtbar wurde, entsprachen aufgrund der Dichte entweder dem Molekulargewichtsbereich des freien S-Proteins oder dem MAC.

Als zweiter Nachweis wurde ein Blot des aufgetrennten Proteinmusters des MAC mit anti-S-Protein-Serum entwickelt. Eine starke Reaktion mit einer Bande bewies ebenfalls das Vorhandensein dieses Proteins im abdissoziierten Komplex (Abb. 6).

In dem entwickelten Blot konnte das S-Protein in dem durch Zymosanaktivierung entstandenen SC5b-9 Komplex und ebenfalls in dem von Wf8 abgespaltenen MAC nachgewiesen werden. Das Protein befand sich in beiden Fällen in exakt der gleichen Position.

3.2. Untersuchung unterschiedlicher Mechanismen der Serumresistenz.

3.2.1. Charakterisierung der Blutkulturstämme.

Nach der Bestimmung der O-Antigen-Serotypen durch das Hygienische Institut der Gesundheitsbehörde Hamburg wurden die Stämme auf den Besitz einer Kapsel allgemein durch Cetavlonfällung und das Vorhandensein der K1 Kapsel mit Hilfe eines K1-Phagentests und der Rocket-immunelektrophorese mit anti-Meningokokken B-Serum untersucht, weil in einigen Veröffentlichungen ein direkter Zusammenhang zwischen dem Kapselbesitz und der

Serumresistenz für Blutkulturstämme beschrieben wurde.
Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Stamm	*	Sero-	*	Kapsel-	*	K1-Phagen-	*	Rocket-
	*	typ	*	fällung	*	test	*	immun-
	*		*		*		*	elek.
BK 152	*	rauh	*	+	*	+	*	+
BK 323	*	0 1	*	+	*	+	*	+
BK 324	*	0 1	*	+	*	+	*	+
BK 526	*	0 1	*	+	*	+	*	+
BK 555	*	0 23	*	+	*	+	*	+
BK 595	*	0 88	*	-	*	-	*	n.d.
BK 651	*	0 13	*	-	*	-	*	n.d.
BK 653	*	0 23	*	-	*	-	*	n.d.
BK 658	*	0 75	*	+	*	+	*	+
BK 783	*	0 3	*	-	*	-	*	n.d.
BK 992	*	0 1	*	+	*	+	*	+
BK 1034	*	0 79	*	-	*	-	*	n.d.
Bk 1164	*	0 8	*	-	*	-	*	n.d.
BK 1306	*	rauh	*	+	*	-	*	n.d.
BK 1361	*	0 53	*	+	*	-	*	n.d.
BK 1404	*	0 1	*	+	*	+	*	+

Tabelle 4. Kapselnachweis mit verschiedenen Methoden
n.d.= nicht durchgeführt

Es konnte mit Hilfe zweier unabhängiger Methoden für die Hälfte der Stämme der Besitz der K1-Kapsel nachgewiesen werden. Die Rocketimmunelektrophorese wurde nur mit den bereits im Phagentest als K1-positiv klassifizierten Stämmen durchgeführt.

3.2.2. Serumresistenz der BK-Stämme.

Die verwendeten BK-Stämme wurden in Serum inkubiert und auf ihr Wachstumsverhalten hin untersucht. Alle Stämme wuchsen in 50% NHS und wurden für diese Serumkonzentration als resistent eingestuft.

3.2.3. Komplementaktivierung durch die serum-resistenten BK-Stämme.

Serumresistente Bakterienstämme sind in der Lage der lethalen Wirkung des Komplementsystems zu entgehen. Für einige dieser Stämme konnte nachgewiesen werden, daß zwar ein MAC gebildet wird, dieser aber abdissoziiert ohne die Bakterien abzutöten. Um zu überprüfen, ob der beschriebene oder ein alternativer Mechanismus z.B. die Blockierung der Aktivierung einer Komplementkomponente als Grundlage für die Serumresistenz der hier verwendeten Stämme anzusehen ist, wurde die Anlagerung bestimmter Komponenten an die Bakterien untersucht.

3.2.3.1. Immunfluoreszenztest mit FITC-markiertem anti-C3 Serum.

Nach Inkubation der Bakterien in 10% NHS wurde die Anlagerung von Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-markierten Antikörpern aufgrund des optischen Eindruckes im Fluoreszenzmikroskop bewertet. Als Kontrolle wurden die Präparate auch stets im Durchlicht (Phasenkontrast) betrachtet. Für die Hälfte der BK-Stämme war eine starke C3 Anlagerung (in Form von C3b) aufgrund der Fluoreszenz nachweisbar. Bei den anderen BK-Stämmen war entweder keine oder nur extrem schwache Fluoreszenz festzustellen (Tab. 5).

3.2.3.2. Immunfluoreszenztest auf C5-Anlagerung.

Die mit einem indirekten Immunfluoreszenztest erhaltenen Ergebnisse über die C5 Anlagerung entsprachen den Resultaten für die C3-Anlagerung (Tab. 5).

3.2.3.3. Immunfluoreszenztest mit FITC-markiertem-anti-Faktor H-Serum.

Die BK-Stämme, bei denen weder eine C3- noch eine C5-Anlagerung festgestellt worden war, wurden daraufhin untersucht, ob C3b möglicherweise erst angelagert und danach inaktiviert worden war. Bei einer solchen Blockierung der Komplementaktivierung besteht die Möglichkeit, daß iC3b nicht mehr vom Antikörper erkannt wird und eine weitergehende Aktivierung und Anlagerung von C5 ausgeschlossen ist. Da die Inaktivierung von C3b durch den Komplement-Faktor I die Bindung von Faktor H an C3b voraussetzt, wurde die Anlagerung von Faktor H mit Hilfe eines direkten Immunofluoreszenztestes untersucht. Alle BK-Stämme, die bei den vorangegangenen Tests weder mit anti-C3, noch mit anti-C5 reagiert hatten, zeigten deutliche Fluoreszenz mit anti-Faktor H-Serum. Umgekehrt konnte bei den übrigen BK- und den Wf-Stämmen keine oder nur äußerst geringe Fluoreszenz nach Inkubation in 5% NHS beobachtet werden (Tab. 5).

Aufgrund der Bindungsmuster wurden die hier verwendeten BK-Stämme in zwei Gruppen eingeordnet. Gruppe I zeigt starke C3 und C5 aber keine Faktor H-Bindung, während Gruppe II die Stämme umfaßt, bei denen weder C3 noch C5 dafür aber Faktor H gut nachweisbar waren. Eine dritte Gruppe von E.coli-Stämmen, die sowohl C3 als auch Faktor H bindet, wurde in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Stamm	*	C3	*	C5	*	Faktor H
Gruppe I	*		*		*	
BK 595	*	+	*	+	*	-
BK 651	*	+	*	+	*	-
BK 653	*	+	*	+	*	-
BK 783	*	+	*	+	*	-
BK 1034	*	+	*	+	*	-
BK 1164	*	+	*	+	*	-
BK 1306	*	+	*	+	*	-
BK 1361	*	+	*	+	*	-
Gruppe II	*		*		*	
BK 152	*	-	*	-	*	+
BK 323	*	-	*	-	*	+
BK 324	*	-	*	-	*	+
BK 526	*	-	*	-	*	+
BK 555	*	-	*	-	*	+
BK 658	*	-	*	-	*	+
BK 992	*	-	*	-	*	+
BK 1404	*	-	*	-	*	+

Tabelle 5. Bindung der Komplementkomponenten C3 und C5 und des Faktors H.

3.2.4. Anlagerung von radioaktiv-markierten Komplementkomponenten an die BK-Stämme.

Bindungsstudien, zur Absicherung der durch die Immunfluoreszenz erhaltenen Ergebnisse, wurden für die BK-Stämme auch mit radioaktiv-markierten Komplementkomponenten (C3 und C6) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Die Menge des gebundenen C3 schwankt innerhalb der beiden Gruppen erheblich, die Werte wurden mit Hilfe des t-Testes verglichen, der Unterschied war nicht signifikant ($p > 0,05$). Die fehlende Bindung von C5 an Bakterien der Gruppe II wurde durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt. Die Anlagerung von C6 an Bakterien

der Gruppe II war im Gegensatz zu Gruppe I Bakterien deutlich reduziert, der Vergleich zeigte einen signifikanten Unterschied ($p < 0,01$). Der Stamm BK 651 (Gruppe I) nahm insgesamt eine Sonderstellung ein, die beiden getesteten Komponenten wurden bei gleicher Zellzahl in wesentlich größerer Menge als von den übrigen Stämmen beider Gruppen gebunden (Tabelle 6).

Stamm	*	C3	*	C6
BK 595	*	1.900	*	380
BK 651	*	6.060	*	1.502
BK 653	*	570	*	650
BK 783	*	910	*	505
BK 1034	*	470	*	360
BK 1164	*	620	*	558
BK 1306	*	1.320	*	392
BK 1361	*	330	*	684
Mittelwert	*	1.523	*	629
$\delta n-1$	*	1.905	*	374
BK 152	*	630	*	101
BK 323	*	1.210	*	121
BK 324	*	n.d.	*	85
BK 526	*	n.d.	*	102
BK 555	*	1.410	*	70
BK 658	*	700	*	131
BK 992	*	300	*	254
BK 1404	*	900	*	152
Mittelwert	*	858	*	127
$\delta n-1$	*	405	*	57

Tabelle 6. Anlagerung von radioaktiv-markiertem C3 und C6 an die BK-Stämme. Die Zahlenwerte wurden als cpm pro 1×10^8 Zellen für die ^{125}J -markierte Komponente errechnet. n.d. = nicht durchgeführt.

3.2.5. Verbrauch von C3 und C5 in NHS durch Inkubation mit BK-Stämmen.

Der C3- und C5-Verbrauch wurde nach Inkubation in 10% NHS für 30 min. mit Hilfe eines hämolytischen Tests

bestimmt. Die Ergebnisse entsprachen den Resultaten der Bindungsstudien mit radioaktiv-markiertem C3 und C6 und sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Stamm	*	C3-Verbrauch	*	C5-Verbrauch	*
	*	in %	*	in %	*
Gruppe I	*		*		*
BK 595	*	40	*	39	*
BK 651	*	91	*	96	*
BK 653	*	49	*	34	*
BK 783	*	40	*	33	*
BK 1034	*	41	*	59	*
BK 1164	*	25	*	38	*
BK 1306	*	85	*	93	*
BK 1361	*	24	*	24	*
Mittelwert	*	49	*	56	*
$\delta n-1$	*	25	*	28	*
Gruppe II	*		*		*
BK 152	*	26	*	16	*
BK 323	*	45	*	18	*
BK 324	*	37	*	18	*
BK 526	*	24	*	20	*
BK 555	*	38	*	20	*
BK 658	*	42	*	21	*
BK 992	*	25	*	23	*
BK 1404	*	22	*	13	*
Mittelwert	*	32	*	19	*
$\delta n-1$	*	9	*	3	*
Kontrolle	*	11	*	18	*

Tabelle 7. C3- und C5-Verbrauch in NHS nach Inkubation mit E.coli. Kontrolle: eine mitinkubierte Serumprobe ohne Bakterien

Der C3-Verbrauch der Gruppe I Bakterien schwankte zwischen 24-91% und der Mittelwert lag bei einer großen Standardabweichung höher als der für die Gruppe II Bakterien. Der Unterschied war aber nicht signifikant ($p > 0,05$), obwohl in der Gruppe II der Mittelwert

der Verbrauchswerte niedriger war und die Werte enger beieinander lagen (kleinere Standardabweichung). Die Werte für den C5-Verbrauch bei Gruppe I Bakterien entsprachen den Zahlen für den C3-Verbrauch. Im Gegensatz dazu konnten für Bakterien der Gruppe II nur geringe Werte ermittelt werden, die um den Kontrollwert (Inaktivierung durch Inkubation) schwankten. Ein Vergleich der Mittelwerte der beiden Gruppen mit dem t-Test zeigte, daß der Unterschied signifikant war ($p < 0,01$).

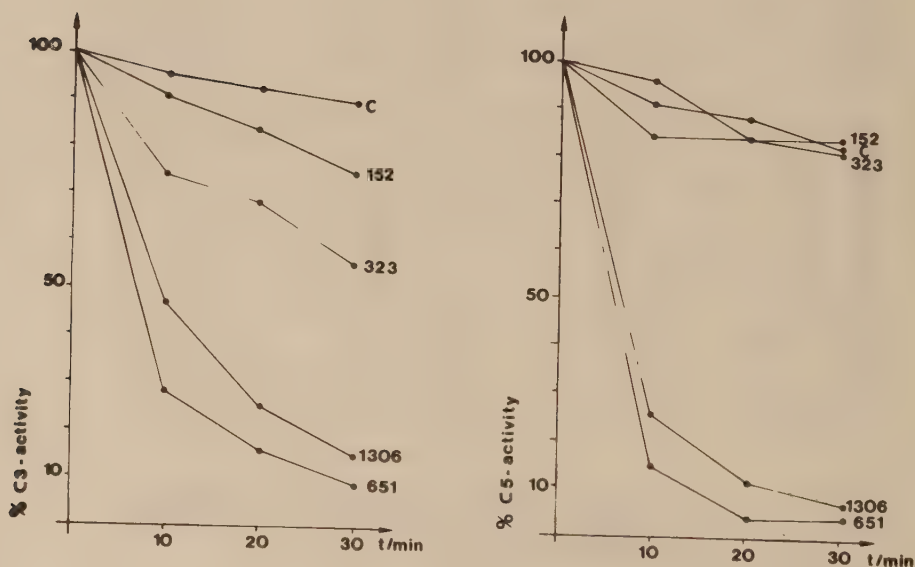


Abb. 7. C3- und C5-Restaktivität nach Inkubation von BK-Stämmen mit 10% NHS. Kontrolle: mitinkubiertes Serum ohne Bakterien. (651 und 1306 = Gruppe I, 152 und 323 = Gruppe II)

Einige typische Kinetiken des C3- und C5-Verbrauches am Beispiel von je 2 Stämmen der Gruppe I und der Gruppe II (mit und ohne deutlichen C5-Verbrauch) sind in Abb. 7 dargestellt.

Die nachweisbare Restaktivität für die beiden Stämme der Gruppe I sank sowohl für C3, als auch für C5 nach 30 min. auf etwa 10% ab. Für die Stämme der Gruppe II kam es zwar in Hinblick auf C3 zu einem Aktivitätsverlust, C5 wurde aber nur in einem der Kontrolle entsprechenden Maße inaktiviert.

3.2.6. Reaktionsweg der Komplementaktivierung durch die BK-Stämme.

Die Aktivierung des Komplementsystems kann sowohl über den alternativen als auch über den klassischen Reaktionsweg erfolgen. Durch die Anlagerung des Faktors H an zellgebundenes C3b wird die weitere Aktivierung von C3 erschwert und damit eine Abtötung der Bakterien über den alternativen Reaktionsweg blockiert. Die Kenntnis des Reaktionsweges der Aktivierung durch die serumresistenten Stämme erscheint daher von Bedeutung und wurde untersucht.

Ein Vergleich des Komplementverbrauches gemessen als CH_{50} und alternativer CH_{50} , sowie eine Bestimmung der C4 Aktivität vor und nach Inkubation mit den Bakterien, kann zeigen, über welchen Reaktionsweg die serumresistenten BK-Stämme das Komplementsystem aktivieren. Die aus diesen Versuchen gewonnenen Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Stamm	*	CH ₅₀	*	Alt.	*	Restakti-	*
	*	E/ml	*	CH ₅₀	*	vität an	*
	*		*	E/ml	*	C4 in %	*
Gruppe I	*		*		*		*
BK 595	*	8,3	*	1,10	*	44,2	*
BK 651	*	6,7	*	0,43	*	35,4	*
BK 653	*	11,7	*	2,28	*	57,7	*
BK 783	*	11,3	*	2,34	*	59,6	*
BK 1034	*	10,6	*	1,50	*	53,8	*
BK 1164	*	10,2	*	2,35	*	51,9	*
BK 1306	*	7,7	*	0,65	*	40,2	*
BK 1361	*	20,6	*	4,15	*	42,1	*
Mittelwert	*	10,9	*	1,85	*	48,1	*
δn-1	*	4,3	*	1,20	*	8,8	*
Gruppe II	*		*		*		*
BK 152	*	22,6	*	4,76	*	44,2	*
BK 323	*	10,7	*	2,02	*	59,6	*
BK 324	*	21,3	*	3,83	*	63,5	*
BK 526	*	16,7	*	2,54	*	53,8	*
BK 555	*	20,6	*	3,12	*	51,9	*
BK 658	*	17,7	*	3,02	*	50,0	*
BK 992	*	19,4	*	2,97	*	46,2	*
BK 1404	*	22,1	*	5,82	*	53,8	*
Mittelwert	*	18,9	*	3,51	*	52,9	*
δn-1	*	3,9	*	1,24	*	6,4	*
Kontrolle	*	23,5	*	8,28	*	100,0	*

Tabelle 8. Komplementverbrauch gemessen in CH₅₀ und alt. CH₅₀, sowie Restaktivität an C4. Die C4-Aktivität des NHS betrug $1,3 \times 10^9$ Mol./ml.

In beiden Gruppen kam es zu einer Aktivierung sowohl des klassischen als auch des alternativen Reaktionsweges. Gruppe I Bakterien verbrauchten dabei in beiden Fällen mehr Komplement. Statistisch betrachtet konnte der Unterschied bei der Aktivierung des klassischen Reaktionsweges als signifikant ($p < 0,01$) und der für den alternativen Reaktionsweg als wahrscheinlich signifikant ($p < 0,02$) gesehen werden. Die Unterschiede der

Reduktion der C4-Aktivität waren geringer ($p > 0,05$), also nicht signifikant, die Ergebnisse bestätigten dabei Aktivierung über den klassischen Reaktionsweg.

3.2.7. Nachweis des abdissoziierten MAC nach Inkubation der BK-Stämme in Serum.

Aufgrund der Aktivierung der Komplementkomponenten C3, C5 und C6 durch Stämme der Gruppe I lag die Vermutung nahe, daß diese BK-Stämme ebenfalls den Mechanismus der Serumresistenz über die Freisetzung des MAC besitzen. Das Ergebnis dieser Überprüfung ist in Abbildung 8 dargestellt.

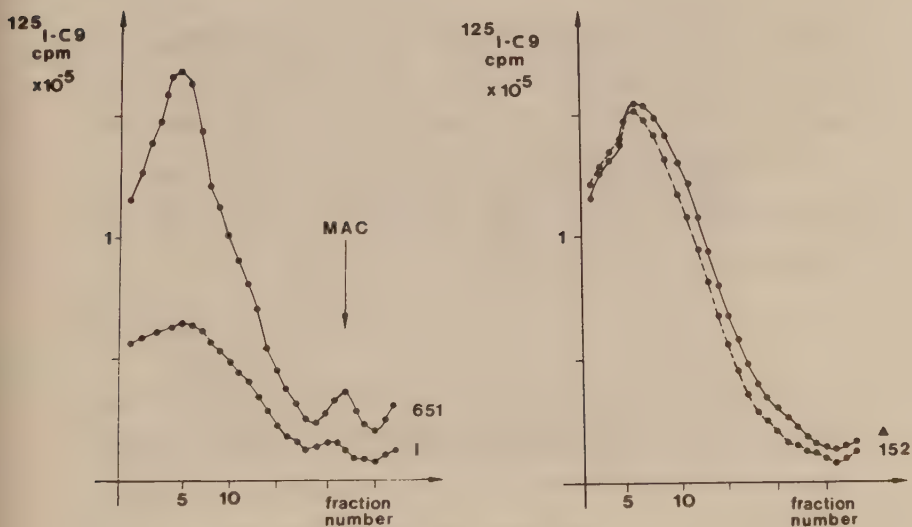


Abb. 8. Saccharose-Dichte-Gradienten Analyse von ^{125}J -C9 im Überstand von Reaktionsansätzen von 651 (Gruppe I) und 152 (Gruppe II).
 ▲ = 152 + hitzeinakt. Serum
 I = Inulin + NHS

Wie die Wf-Stämme und ihre Mutanten wurden auch die BK-Stämme in Serum inkubiert, dem radioaktiv-markiertes C9 zugefügt worden war. Die Serumüberstände wurden nach der Inkubation über einen linearen Saccharose-Dichtegradienten aufgrund ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Für die Stämme, bei denen sowohl C3 als auch C5 angelagert bzw. verbraucht wurden (Gruppe I), konnte ein abdissoziierter MAC nachgewiesen werden. Die BK-Stämme, die durch eine starke Faktor H-Bindung und keinen oder nur sehr geringen C5-Verbrauch charakterisiert waren (Gruppe II), bildeten keinen nachweisbaren Komplex.

3.2.8. Weitere Untersuchungen der verwendeten BK-Stämme.

Einzelne Bakterienbestandteile, wie z.B. bestimmte Proteine der äußeren Membran, das LPS und der Kapselgehalt wurden in der Literatur mit der Serumresistenz in direkten Zusammenhang gebracht. Aus diesem Grunde wurden die obengenannten Parameter für die BK-Stämme ermittelt und die beiden Gruppen miteinander verglichen.

3.2.8.1. Proteinmuster der äußeren Membran der BK-Stämme.

Die Proteinmuster der äußeren Membranen der BK-Stämme unterschieden sich erwartungsgemäß recht stark voneinander. Die beiden Mechanismen der Serumresistenz konnten nicht mit dem einen oder anderen Proteinmuster oder einem einzelnen Protein korreliert werden (Abb. 9).

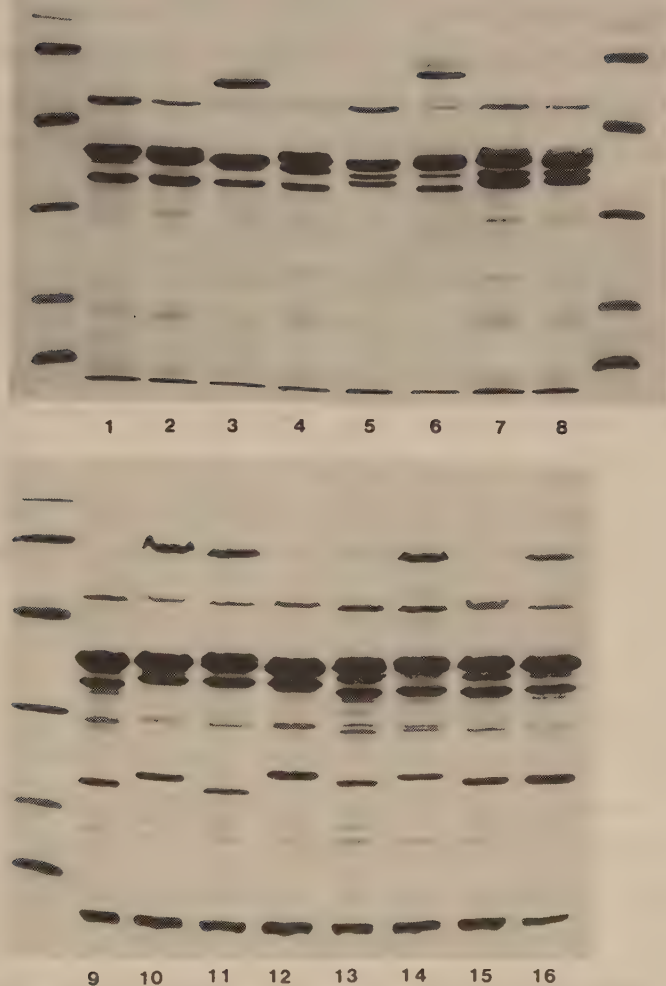


Abb. 9. Protein-Muster der äußeren Membranen von
 Stämmen der Gruppe I:
 BK 595 (1), 651 (2), 653 (3), 783 (4),
 1034 (9), 1164 (10), 1306 (11), 1361 (12);
 und der Gruppe II:
 152 (5), 323 (6), 324 (7), 526 (8),
 555 (13), 658 (14), 992 (15), 1404 (16).

Väisänen-Rhen et al. (1984) und Achtman et al. (1986), veröffentlichten vergleichende Untersuchungen an E.coli Stämmen, bei denen sie unter anderem die Proteinmuster der äußeren Membranen auftrennten und anhand weniger Banden, die die Hauptproteine repräsentieren, eine Einteilung vornahmen. Die Autoren sahen eine direkte Verbindung verschiedener Virulenzfaktoren, z.B. dem Besitz der K1-Kapsel und einer reduzierten Phagozytose, weshalb auch in der hier vorliegenden Arbeit versucht wurde, die Proteinmuster der BK-Stämme in die genannte Klassifizierung einzuordnen. Wegen der nur auszugsweisen Wiedergabe der Muster und ohne Angabe von Größenmarkern konnte aber eine solche Einordnung der eigenen Ergebnisse in die vorgegebene Einteilung nicht erfolgen.

3.2.8.2. Bestimmung des Protein- und KDO-Gehaltes der BK-Stämme.

Mit Hilfe eines qualitativen Verfahrens, der Untersuchung der Proteinmuster, konnte kein Aufschluß über die molekularen Grundlagen der beiden Mechanismen der Serumresistenz erhalten werden. Die Ermittlung des Protein- und KDO-Gehaltes der BK-Stämme als quantitative Methode wurde daher zusätzlich durchgeführt. Die ermittelten Zahlenwerte sind in μg Protein bzw. KDO/mg Bakterien-Trockengewicht in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Die Stämme beider Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede ihres Proteingehaltes ($p > 0,05$), die Standardabweichungen waren ebenfalls vergleichbar. Auch

beim Vergleich des KDO-Gehaltes traten keine signifikanten gruppenspezifischen Unterschiede auf ($p > 0,05$). Allgemein betrachtet, befanden sich in der Gruppe I vier Stämme mit geringem KDO-Gehalt ($< 40 \mu\text{g}$ KDO/mg Bakterien-Trockengewicht) im Gegensatz zu nur einem Stamm in der Gruppe II.

Stamm	* μg Protein *	* μg KDO *	* μg Neuraminsäure *
Gruppe 1	*	*	*
BK 595	* 240	* 15,5	* 4,5
BK 651	* 300	* 29,0	* 5,1
BK 653	* 330	* 26,0	* 5,7
BK 783	* 390	* 33,0	* 3,9
BK 1034	* 360	* 54,0	* 6,4
BK 1164	* 410	* 52,0	* 8,0
BK 1306	* 340	* 43,0	* 8,3
BK 1361	* 395	* 78,5	* 9,3
Mittelwert	* 346	* 41,5	* 6,4
$\delta n-1$	* 56	* 19,9	* 1,9
Gruppe II	*	*	*
BK 152	* 330	* 74,0	* 36,1
BK 323	* 380	* 53,5	* 23,1
BK 324	* 310	* 88,5	* 22,4
BK 526	* 340	* 70,5	* 23,3
BK 555	* 410	* 58,5	* 15,6
BK 658	* 295	* 29,5	* 21,2
BK 992	* 385	* 72,0	* 19,4
BK 1404	* 410	* 43,5	* 21,2
Mittelwert	* 358	* 61,3	* 22,8
$\delta n-1$	* 45	* 18,9	* 5,9

Tabelle 9. Protein-, KDO- und Neuraminsäuregehalt der BK-Stämme beider Gruppen.

3.2.8.3. Neuraminsäuregehalt der verwendeten BK-Stämme.

Eine Korrelation zwischen dem Besitz der K1 Kapsel und dem alternativen Mechanismus der Serumresistenz ist für die Gruppe II Bakterien nicht auszuschließen.

Die K1 Kapsel besteht zu einem großen Teil aus Neuraminsäure, dessen Gehalt in den BK-Stämmen bestimmt wurde. Die Ergebnisse (μg Neuraminsäure/mg Trockengewicht) sind ebenfalls der Tabelle 9 zu entnehmen.

Für die Stämme der Gruppe II konnte deutlich mehr Neuraminsäure als für die Stämme der Gruppe I nachgewiesen werden, wobei die Standardabweichung der Zahlenwerte für den Neuraminsäuregehalt in der Gruppe II größer war. Statistische Vergleiche ergaben einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p < 0,01$).

4. Diskussion

4.1. Neue Fakten zu dem bereits bekannten Mechanismus der Serumresistenz.

Der Mechanismus der Serumresistenz durch Freisetzung eines auf der Bakterienoberfläche gebildeten MAC ohne Zerstörung der Integrität der Zelle ist für E.coli (Joiner et al., 1984b) nachgewiesen worden. Die molekularen Ursachen, die dieser Schutzfunktion zugrunde liegen, sowie Interaktionen der Komplementkomponenten untereinander und mit dem Bakterium sind im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Durchführung der Experimente sind serum-resistente und -sensible Bakterienstämme, die möglichst wenige stammspezifische Besonderheiten aufweisen. Die hier dargestellten Daten sind mit isogenen Pärchen, bestehend aus dem Wildstamm und seiner Mutante, gewonnen worden. Aus diesem Grunde ist auch der Vergleich der Stämme an den Anfang der Diskussion gestellt worden.

4.1.1. Charakterisierung der Wf-Stämme und ihrer Mutanten.

Nach der Konjugation der Wf-Stämme mit dem Donorstamm W3110K12 R6K kann nur eine extrem geringe Zahl an Transkonjuganten selektioniert werden. Dies muß eine spezifische Eigenschaft der Wf-Stämme sein, weil unter gleichen experimentellen Bedingungen Kontomichalou et al. (1970) mit einem Laborstamm als Rezipient 10^5

Transkonjuganten isoliert haben, während mit Wf8 nur 3 und mit Wf26 9 Stämme selektioniert werden konnten. Eine spätere Untersuchung der Transkonjuganten hat ergeben, daß nur Mutanten selektioniert worden sind, die Mutation stellt also in diesem Falle die Voraussetzung für eine erfolgreiche Konjugation dar. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse von Molina et al. (1984) gestützt. Die Autoren beschreiben, daß Mutanten von E.coli O26 als Rezipienten eine höhere Transkonjugationsrate aufweisen als die Wildstämme. Einer der von uns benutzten E.coli Stämme besitzt ebenfalls die O26 Serogruppe.

Coratza et al. (1984) weisen für die von Molina et al. (1984) benutzten Stämme mit Hilfe von R-Phagen und durch Agglutinationstests nach, daß die Mutanten im Gegensatz zum Wildstamm Rauhformen darstellen. Die Mutanten der Wf-Stämme zeigen ebenfalls den Verlust der langkettigen Polysaccharidseitenketten im LPS-Gel, agglutinieren weniger gut mit α -Seren, reagieren aber weiterhin im Ganzzell-ELISA. Es ist also durch die Mutation zu einer Veränderung in der LPS-Struktur gekommen, die Stämme besitzen aber noch genügend serotypische Eigenschaften um als semi-Rauhstämme bezeichnet zu werden.

Neben der Veränderung der LPS-Struktur sind die Mutanten durch die fehlende Hämolysinsekretion gekennzeichnet. Die Untersuchung des genetischen Hintergrundes dieser Mutation ist mit Hilfe von Hybridisierungsexperimenten durchgeführt worden. Die Hämolysin-Gen-spezifischen Pro-

ben (Plasmid pAN 215 besitzt Teile des hlyA-Genes (Noegel et al., 1981) und das Plasmid pAN 505 Teile des hlyB_L-Genes) hybridisieren mit restringierten DNA-Proben der α -hämolytischen Wildstämme Wf8 und Wf26. Diese Sequenzhomologie fehlt für das Plasmid pAN 505 bei den Mutanten, eine Deletionsmutation im hlyB-Gen ist als Ursache dafür anzusehen. Die Isolation mehrerer Mutanten aus einem Konjugationsexperiment zeigt, daß es sich bei dieser Deletionsmutation um ein Ereignis handelt, das mit größerer Häufigkeit als andere Spontanmutationen erfolgt. Hacker et al. (1983a) beschreiben einen E.coli O6-Stamm, bei dem ebenfalls nicht-induzierte Mutationen der Hämolysin-Gene mit einer hohen Mutationsrate von 10^{-3} bis 10^{-4} erfolgen. Das Ergebnis erscheint deshalb vergleichbar, weil sowohl der Stamm Wf8 als auch Wf26 den O6 Serotyp besitzen.

Die Mutanten weisen im Vergleich zu ihren Parentalstämmen ein leicht verändertes Proteinmuster der äußeren Membran auf, wesentliche Unterschiede können nicht festgestellt werden. Aufgrund der Mutation in der Genregion, die Genprodukte kodiert, die für die Sekretion des Hämolytins erforderlich sind, also in Zusammenhang mit der äußeren Membran stehen, ist ein deutlicheres Bild vermutet worden. Die Ergebnisse von Härtlein et al. (1983) entsprechen dieser Vorstellung, denn sie zeigen, daß das Genprodukt des hlyB-Genes vorwiegend mit den Fraktionen der äußeren Membran zusammen isoliert werden kann.

Der einzige deutliche Unterschied zwischen den Wildstämmen und ihren Mutanten ist auf molekularer Ebene neben dem Verlust von langkettigen Polysaccharidseitenketten und Teilen des HlyB_L-Genes (vermutlich auch flankierender Sequenzen) die veränderte Kapsel. Aus dem Ergebnis der Immunelektrophorese kann darauf geschlossen werden, daß die Mutanten Wf8 R6K und Wf8/2 R6K mehr Kapselmateriel produzieren (deutlichere Präzipitation mit Cetavlon), und die veränderte Lage der Bande im Gel (weitere Laufstrecke zum positiven Pol) weist auf eine andere Ladung des Materials hin. Eine Quantifizierung der K13 Kapsel ist nicht möglich, weil sie zu 40 % aus KDO, einem wesentlichen Bestandteil des LPS besteht (Vann und Jann, 1979). Ein Zusammenhang zwischen der K13-Kapsel und der Serumresistenz ist in früheren Veröffentlichungen diskutiert worden. Glynn und Howard (1970) können bei einem Vergleich der K13-Kapsel von vier O6:K13 Stämmen (darunter auch die Wildstämme Wf8 und Wf26) feststellen, daß bei Stämmen mit einem hohem Kapselgehalt (gemessen mit der Mancini-Technik) selbst große Komplementmengen nur zu einer partiellen Abtötung führen. Physiologische Unterschiede der K13-Antigene der Stämme sind in den Untersuchungen nicht ausgeschlossen worden. Howard und Glynn (1971) beschreiben, daß das Molekulargewicht des Kapselantigens (und damit der Grad der Polymerisation) in direktem Bezug zur Serumresistenz zu sehen ist und auch die sterische Anlagerung der Kapsel an die Bakterienoberfläche eine Rolle spielen kann.

4.1.2. Mögliche Ursachen der Serumresistenz.

Ein direkter Nachweis dafür, welche der molekularen Veränderungen für den Verlust der Serumresistenzeigenschaft verantwortlich ist, steht noch aus. Die Veränderung der LPS-Struktur bei den Mutanten kann mit der verminderten Serumresistenz in Verbindung gebracht werden. In der Literatur finden sich eine Anzahl von Veröffentlichungen, in denen beschrieben wird, daß Rauhsämme serum-empfindlicher sind als Glattsämme (Nelson und Roantree, 1967, Rowley, 1968, Goldman et al., 1984, Sansano et al., 1985). Eine Korrelation zwischen der nachgewiesenen Menge an LPS und der Serumresistenz ist auch für einzelne E.coli Stämme gezeigt worden (Wardlaw, 1963, Feingold, 1969, Morrison und Kline, 1977), während in anderen Untersuchungen die Zusammensetzung des LPS, nicht aber die Quantität von Bedeutung zu sein scheint (Taylor, 1976, Goldman et al., 1984). Andererseits können Gemski et al. (1980), Opal et al. (1982) und Cross et al. (1984a) Rauhsämme isolieren, bei denen offensichtlich das Fehlen langkettiger Polysaccharidseitenketten eine untergeordnete Bedeutung für die Ausbildung der Serumresistenz besitzt, weil in den beschriebenen Fällen vermutlich die K1-Kapsel für die Ineffektivität des Komplementangriffs verantwortlich ist.

Der mengenmäßige Unterschied bei der Bindung von radioaktiv markiertem C3 an die Zelloberfläche der serum-sensiblen Mutante verglichen mit dem -resistenten Wild-

typ kann vermutlich auf die geänderten molekularen Verhältnisse der Mutante zurückgeführt werden. Das Verhältnis der C3 Bindung beträgt 1,3 : 1 (Mutante : Wildtyp). Es ist auf der Basis der gebundenen Moleküle pro cfu errechnet worden. Das Ergebnis steht im Gegensatz zu den Beobachtungen von Joiner et al. (1984a). Ebenfalls für E.coli ist in diesem Artikel gezeigt worden, daß der serum-resistente Stamm mehr C3 Moleküle als die beiden isogenen serum-sensiblen Stämme bindet. Dieser Unterschied kann stammspezifisch sein, weil sowohl der serum-resistente als auch einer der beiden serum-sensiblen Stämme von dem anderen sensiblen Stamm abstammen. Es ist zu vermuten, daß in diesem Falle die molekulare Zusammensetzung der äußeren Membran oder des LPS oder eine unterschiedliche Anlagerung der Polysaccharide an den Lipid A-Teil vorliegt als bei dem Wf-Stamm und seiner Mutante. Die Bedeutung der Strukturen in der Lipidschicht (Lipid A) des LPS-Moleküls auf Antikörper-unabhängige Aktivierung des klassischen Reaktionsweges ist von Vukajlovich et al. (1986) erst kürzlich erneut bewiesen worden.

Die Mutation im Bereich des hlyB-Genes kann die molekulare Basis für den Verlust der Serumresistenz eigen-schaft darstellen. Hacker et al. (1983b) erwähnen, daß eine Reihe von Genen (hly-Gene und Sequenzen in Verbindung mit der Hämagglutination und der Serumresistenz) nahe beieinander auf dem Chromosom lokalisiert sind.

Eine solche Verbindung der genetischen Information für das Hämolysin, die Hämagglutination und das O6-Antigen ist auch von Czirók (1985), allerdings ohne einen Hinweis auf die Serumresistenz, beschrieben worden. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Serumresistenz und dem chromosomalen hly-Gen und seinen flankierenden Sequenzen ist von Hacker (persönliche Mitteilung) beobachtet worden. Eine Deletionsmutante im Bereich dieser Gene weist eine verminderte Serumresistenz auf. Das Ergebnis wird durch den Verlust der Resistenzeigenschaft der Stämme Wf8 R6K, Wf8/2 R6K, Wf26/7 R6K und Wf26/9 R6K bestätigt. Bei einer ähnlichen Mutation ist es also ebenfalls zu einem Verlust der Serumresistenz gekommen.

Die Veränderungen der Proteinmuster der Mutanten im Gegensatz zu denen des jeweiligen Wildstammes sind, wie bereits erwähnt, weniger deutlich ausgefallen als erwartet worden ist. Ein Zusammenhang zwischen diesem Ergebnis und der verminderten Serumresistenz ist nicht wahrscheinlich, obwohl eine Anzahl von Genen oder Genprodukten als molekulare Basis für eine erhöhte Serumresistenz beschrieben worden sind (Smith, 1974, Reynard und Beck, 1976, Fietta et al., 1977, Reynard et al., 1978, Binns et al., 1979, Ogata und Levine, 1980, Moll et al., 1980, Timmis et al., 1981, Binns et al., 1982, Ogata et al., 1982). In den zitierten Versuchen kommt es zwar zu geringen Steigerungen der Serumresistenz z.B.

durch das tra T-Protein in Kaninchen- und Meerschweinchen-
serum, nicht aber in NHS (Ogata und Levine, 1980).
Damit kann also keine relevante Veränderung der Eigen-
schaft Serumresistenz erzielt werden.

Ein Einfluß des Plasmids R6K auf die Ausprägung der
Serumresistenz kann ausgeschlossen werden, weil nach
erfolgreichem Curing der Stamm Wf8/2 selbst bei einer
Serumkonzentration von nur 3 % abgetötet worden ist.

4.1.3. Serumresistenz der Wildstämme und ihrer Mutanten.

Zur Untersuchung der Serumresistenz bei den Wf-Stämmen
und ihren Mutanten ist NHS verwendet worden, weil es die
stärkste bakterizide Wirkung besitzt, wie der Vergleich
der Wachstumskurven bei Verwendung von unterschiedlichen
Serumspezies und dem serumsensiblen Stamm Wf26/7 R6K
belegt. Alle Versuche zur Resistenzbestimmung wurden mit
Hilfe der cfu-Methode durchgeführt. Zwar ist diese
Methode zeit- und material-aufwendig (Moll et al., 1979)
und es können nur die Bakterien nachgewiesen werden, die
nach der Inkubation in Serum noch in der Lage sind auf
festem Nährboden wieder anzuwachsen und Kolonien zu
bilden, aber die geringe Störanfälligkeit und somit die
Präzision der Methode überwiegen die genannten Nach-
teile.

Die Zugabe des Serums erfolgt stets in der logarith-
mischen Wachstumsphase, weil die Bakterien zu diesem
Zeitpunkt am empfindlichsten für die bakterizide Wirkung

sind (Rowley und Wardlaw, 1958, Davis und Wedgwood, 1965, DeMatteo et al., 1981).

Die Bewertung der Stämme erfolgt nach den im Methodenteil aufgeführten Kriterien. Die Lebendzellzahl wird anhand der cfu aus drei verschiedenen Verdünnungen errechnet. Bei den serum-resistenten und -sensiblen Stämmen ist die Schwankungsbreite der Ergebnisse stets gering. Für eventuelle experimentelle Fehler ist eine Abweichung von einer Zehnerpotenz bei der Klassifizierung berücksichtigt worden.

Unter Berücksichtigung all dieser Kriterien zeigen die Wf-Stämme bei mindestens 20 % NHS Resistenz (für Wf8 kann sogar bei 90 % NHS keine Reduktion der cfu festgestellt werden), wohingegen die Mutanten alle schon bei 3 % NHS sensibel sind.

Zusätzliche Versuche zur Abtötung der serum-sensiblen Mutante (Wf26/7 R6K) sind unter Zugabe des Kalzium-chelators EGTA durchgeführt worden, wobei nach Inkubation in 3 % NHS für eine Stunde eine leichte Erhöhung der cfu zu beobachten ist. Bei höheren Serumkonzentrationen (20 %) kann auch unter EGTA-Einfluß eine Reduktion der Lebendzellzahl beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen sich vermutlich durch die zu starke Verdünnung einzelner Komponenten erklären. Eine direkte Korrelation zwischen der Konzentration von Komplement-komponenten und der Lyse von Erythrozyten ist von Schreiber et al. (1978) sowohl für isolierte Komponenten

des alternativen Reaktionsweges als auch für C4-depletiertes Serum beschrieben worden. Bei Serumkonzentrationen unter 10 % kann kaum Lyse beobachtet werden, während die Lyse über den alternativen Reaktionsweg bei Konzentrationen zwischen 10 und 30 % für Kaninchenerythrozyten nahezu linear ist.

Ein solcher Einfluß der Serumkonzentration auf die Ergebnisse der Resistenztests des Stammes Wf8/2 R6K muß ebenfalls vermutet werden. In 10 % C2-depletiertem Serum steigt die Zahl der cfu innerhalb einer Stunde an, während bei Ausschaltung des alternativen Reaktionsweges (B-depletiertes Serum bzw. Zugabe von EGTA zu NHS) eine deutliche Abtötung, allerdings nicht so stark wie mit NHS, zu beobachten ist. Damit ist die Beteiligung des alternativen Reaktionsweges an dem in NHS ablaufenden Abtötungsprozeß bewiesen. Die bakterizide Wirkung des Serums wird aber hauptsächlich über die Aktivierung des klassischen Reaktionsweges erzielt.

Bei einstündiger Inkubation in 10 % C6- oder C8-depletiertem Serum ist für die serum-sensible Mutante Wf8/2 R6K ein Anstieg der cfu zu beobachten. Das Ergebnis beweist, daß zumindest diese beiden späten Komplementkomponenten für die Abtötung des Bakterienstammes absolut erforderlich sind. Zur Rekonstitution der bakteriziden Wirkung des C6-depletierten Serums ist die Zugabe der physiologischen Konzentration erforderlich, andernfalls kommt es zwar zur Abtötung, volle Effektivität

tät kann aber nur mit vollständig rekonstituiertem Serum erreicht werden.

Bei der serum-sensiblen Mutante Wf8/2 R6K kommt es auch in Abwesenheit der Komponente C9 zu einer deutlichen Verringerung der cfu bei einstündiger Inkubation in höheren Serumkonzentrationen. Mit 5 bzw. 10 % C9-depletiertem Serum kann die Lebendzellzahl entweder nicht (111 %) oder nicht vergleichbar (13,6 %) abgesenkt werden. Erst 25% dieses Serums lassen die Zahl der cfu auf Werte von etwa 0,2 % sinken. Dies kann auch eine Erklärung für die Ergebnisse von Joiner et al. (1985b) sein, die bei einem serum-sensiblen E.coli Rauhestamm (J5) in Abwesenheit von C9 keine Abtötung nachweisen können. Die Autoren beobachten, daß in maximal 10 % C8-defizientem Patientenserum nach Zugabe von C8 verglichen mit den Werten nach Rekonstitution mit C8 und C9 im Durchschnitt wenigstens drei Moleküle C9 pro C5b-9 Komplex zur Abtötung innerhalb von 30 min benötigt werden. Das Serum ist vor dem Gebrauch absorbiert worden, um spezifische Antikörper zu entfernen, und zusätzlich ist auch die gesamte Lysozymaktivität beseitigt worden. Die Vorbehandlungen des defizienten Patientenserums und die ohnehin geringe eingesetzte Menge haben vermutlich zur Folge, daß eine der frühen Komponenten in reduzierter Konzentration vorliegt, was bei der Bewertung der Ergebnisse durch die Verfasser nicht berücksichtigt worden ist.

Im Gegensatz dazu ist in einer Anzahl von Publikationen beschrieben worden, daß C9 nicht essentiell für die Abtötung von Bakterien durch das Komplementsystem ist. Harriman et al. (1981) zeigen für *Neisseria gonorrhoeae* Abtötung in C9-depletiertem Serum, und Lint et al. (1980) beschreiben Experimente mit Serum eines C9-defizienten Patienten. Dabei ist die bakterizide Wirkung auf einen serum-sensiblen *E.coli* Stamm mit der des NHS durchaus vergleichbar. Eine Besonderheit stellt aber die verzögerte Reduktion der Zellzahl dar, die Effektivität der Abtötung durch das defiziente Serum liegt zeitlich hinter der des NHS zurück, vergleichbare Zahlenwerte werden erst nach einer Inkubationszeit von drei Stunden erreicht. Eventuell kann diese Beobachtung auch die oben beschriebene geringere Verminderung der cfu auf 13,6 % bei einstündiger Inkubation erklären. Aber nicht nur für Bakterien sondern auch für menschliche Lymphomazellen ist der C5b-8 Komplex zur Abtötung bzw. Lyse ausreichend (Morgan et al., 1986).

4.1.4. Zusammensetzung und Abdissoziation des MAC

Die Fortführung der Komplementkaskade durch die Bildung des MAC ist anhand des Wildstammes und seiner Mutante untersucht worden. Bei einem Vergleich zwischen Wf8 und Wf8/2 R6K nach Präinkubation in NHS kann bewiesen werden, daß auf der Mutante die Komponenten C6, C7 und C8 in vier- bis sechsfacher Menge im Vergleich zum Wildtyp gebunden sind. Die Werte der drei Komponenten ähneln

sich sehr, während im Gegensatz dazu das Verhältnis für C9 mit 13:1 einen eindrucksvollen Unterschied darstellt. Eine Erklärung für diese Beobachtung geben Joiner et al. (1984a). Sie können zeigen, daß ein MAC, der an einen Stamm bindet und ihn abtötet (Mutante), einen höheren Grad der C9 Polymerisation aufweist als ein MAC, der auf einem serum-resistenten Stamm gebildet wird und dann abdissoziiert (Wildtyp).

In C8-depletiertem Serum liegen die Komponenten des MAC bis einschließlich C7 vor. Sie werden an die Zellen im Verhältnis 1 : 1 gebunden, d.h. es wird die gleiche Menge an radioaktiv-markiertem C6 sowohl von der Mutante als auch vom Wildtyp gebunden. Die Mutante bindet in dem C8-depletierten Serum ebensoviel C6 wie in NHS, während für den Wildstamm in diesem Ansatz mehr C6 nachgewiesen werden kann.

Die Situation ändert sich aber in Anwesenheit von C8 (Parallelversuch in C9-depletiertem Serum). Auf der Mutante kann im Vergleich zum Wildtyp erneut eine sechsfache Menge an C6 nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis belegt, daß bereits die Interaktion der Komponente C8 mit dem C5b-7 Komplex ausreicht, um den MAC von der äußeren Membran abzulösen. C9 scheint also weder für die Ablösung des MAC vom Wildstamm Wf8, noch für die Abtötung seiner Mutante Wf8/2 R6K unbedingt erforderlich zu sein.

Der direkte Nachweis des abdissoziierten MAC im Serum-überstand ist nach Inkubation mit dem Wildstamm Wf8 erbracht worden. Die Freisetzung des Komplexes von der Bakterienoberfläche erklärt auch das Ergebnis, das beim quantitativen Vergleich der gebundenen Komponenten C6, C7 und C8 erhalten worden ist. Die genannten Komponenten binden bei der serum-sensiblen Mutante an die Zellen, während sie auf dem Wildtyp zwar ebenfalls in den MAC integriert werden, dieser aber abdissoziiert. Die Komponenten sind folglich nicht mehr auf den Zellen nachweisbar.

Aufgrund seiner Lage im Saccharose-Dichte-Gradienten ähnelt der abdissoziierte MAC mehr einem in freier Lösung durch Inulin- oder Zymosanaktivierung entstandenen SC5b-9 Komplex als einem MAC der aus Erythrozytenmembranen isoliert worden ist. Die beiden Komplexe besitzen verschiedene Molekulargewichte (etwa 10^6 für SC5b-9 und etwa $1,7 \times 10^6$ für den MAC, Podack et al., 1984), die auf die unterschiedlichen Zusammensetzungen zurückzuführen sind. Der SC5b-9 Komplex setzt sich aus 3 Molekülen S-Protein, je einem Molekül C5b, C6, C7 und C8 sowie 3 Molekülen C9 zusammen (Kolb und Müller-Eberhard, 1975), während der MAC durch die C9 Polymerisation bis zu 21 Moleküle C9 besitzen kann (Podack et al., 1982).

Ein erster Hinweis auf einen Komplex mit einem geringeren Molekulargewicht als ein membrangebundener MAC und

dadurch auch mit einer anderen molekularen Zusammensetzung ist für den aus dem Serumüberstand isolierten MAC durch die Lage im Saccharosegradienten mit Hilfe von radioaktiv-markiertem C9 erhalten worden. Die Versuche sind unter identischen Bedingungen mit C6 als Marker wiederholt worden, wobei sich ein identisches Bild ergeben hat. Als Kontrolle für die Größe des abdissoziierten Komplexes ist Inulin-aktiviertes Serum verwendet worden, als Negativkontrolle diente die serum-sensible Mutante Wf8 R6K und hitzeaktiviertes Serum nach Inkubation mit Inulin.

Zur näheren Untersuchung ist der abdissoziierte MAC aufgrund seiner Lage im Saccharose-Dichte Gradienten isoliert und auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt worden. Das Proteinmuster ist mit den von Kolb und Müller-Eberhard (1975) und Bhakdi und Tranum-Jensen (1982a) veröffentlichten Ergebnissen verglichen worden. Aufgrund der Lage zueinander ist eine vorläufige Zuordnung der Komplementkomponenten vorgenommen worden. Es wird dabei deutlich, daß C9 nicht in hochmolekularer Form, sondern in nachweisbarer Menge nur als Monomer und als Dimer vorliegt. Die starke Anfärbung im obersten Gelbereich kann auf intakten, nicht aufgetrennten MAC zurückgeführt werden.

Eine empfindlichere Nachweismethode für monomeres C9 und seine polymeren Formen stellt die Übertragung des Proteinmusters auf Nitrozellulosefilter und eine an-

schließende Entwicklung dieses Blots mit α -C9 Serum dar. Monomeres C9 kann dabei als deutliche Bande identifiziert werden (die Lage bestätigt die Zuordnung aufgrund der Referenzen), eine weitere, wenn auch schwächere Bande kennzeichnet das C9 Dimer. Zusätzlich deutet die schwache Färbung im hochmolekularen Bereich auf die verschiedensten polymeren Formen von C9 hin, ohne daß es dabei zu einer deutlichen Häufung eines Polymerisationsgrades kommt.

Bei der Auftrennung des abdissoziierten MAC im Gel wird eine Bande sichtbar, die aufgrund ihrer Lage das S-Protein darstellen kann. Bhakdi et al. (1976) können dieses Protein in dem Erythrozyten-gebundenen MAC nicht nachweisen. Diese Beobachtung ist nicht verwunderlich, weil, wie bereits in der Einleitung dargestellt, das S-Protein mit den Membranlipiden um die metastabile Bindungsstelle konkurriert.

Mit Hilfe der Immunoblot-Technik kann sowohl in dem durch Zymosanaktivierung entstandenen SC5b-9 Komplex als auch in dem nach Inkubation mit Wf8 abdissoziierten Komplex das S-Protein nachgewiesen werden. In beiden Fällen kann eine Bande in exakt derselben Gelposition angefärbt werden. Das S-Protein als Bestandteil des abdissoziierten MAC ist auch mit der Doppeldiffusionstechnik nach Ouchterlony in den Fraktionen des Saccharose-Dichte-Gradienten, die den hochmolekularen Komplex enthalten, nachgewiesen worden. Das Vorhandensein des

S-Proteins in dem Komplex ist zweifelsfrei festgestellt worden.

Diese Beobachtung steht offensichtlich nicht im Einklang mit den bisher veröffentlichten Ergebnissen, insbesondere weil in C8-depletiertem Serum der C5b-7 Komplex an den Bakterien verbleibt, obwohl es auf dieser Stufe durch die Anlagerung des S-Proteins zur Loslösung des Komplexes kommen sollte (Kolb und Müller-Eberhard, 1973). Aufgrund der Beobachtungen muß davon ausgegangen werden, daß die Zeitpunkte für die Anlagerung des S-Proteins und die Freisetzung des Komplexes von der Bakterienoberfläche im Gegensatz zu den bei der Aktivierung mit Inulin oder Zymosan beobachteten Verhältnissen verschoben sind.

Die bisherigen Erkenntnisse, sowohl über die Bildung eines SC5b-9 Komplexes in freier Lösung als auch über die Vorgänge und Zusammensetzung des abdissoziierten MAC, sind in der nachfolgenden Hypothese zusammengefaßt. Nach der Bindung der Komponente C7 an den über das C3b Molekül an die Membran gebundenen C5b,6 Komplex kommt es zwar zur Freisetzung der metastabilen Membranbindungsstelle, aber aufgrund bisher nicht bekannter molekularer Verhältnisse auf der Bakterienoberfläche wird weder die Position am C3b verlassen noch findet eine Verankerung des Komplexes über die C7 Untereinheit statt.

Die Bindungs- und Integrationsaktivität des C7 ist in einem künstlichen System unter Benutzung von

Phospholipidvesikeln und C7 in dimerer Form von Preissner et al. (1985b) nachgewiesen worden. Durch Inkubation der Komponente mit dem Detergens Deoxycholat (DOC) kommt es zur Dimerisation, die mit den physiologischen Aktivitäten des C7, der Ausprägung einer hydrophoben Bindungsstelle nach der Anlagerung an den C5b,6 Komplex und der nachfolgenden Insertion des C5b-7 in die Membran, verbunden zu sein scheint. Ob, wie Joiner et al. (1984a) vermuten, die Zusammensetzung des LPS als Ursache für die fehlende Integration des Komplexes anzusehen ist, kann durch diese Ergebnisse nicht geklärt werden.

C8 bindet an den nur lose gebundenen C5b-7 Komplex, das S-Protein lagert sich an die bisher nicht besetzte Membranbindungsstelle oder eine benachbarte Position und der SC5b-8 Komplex wird freigesetzt. Dadurch, daß der Komplex nicht in die Membran integriert, sondern nur lose über das C3b gebunden worden ist, kommt es nicht zu einer Beschädigung des Bakteriums.

Der geringe Grad der C9 Polymerisation in dem abdissoziierten Komplex entspricht dem des durch Zymosanaktivierung entstandenen SC5b-9. Podack et al. (1984) können zeigen, daß das S-Protein für die Unterdrückung der Polymerisation von C9 durch den SC5b-8 Komplex verantwortlich ist. Die Autoren beschreiben aufgrund ihrer Untersuchungen, daß das S-Protein mit den durch Zymosanaktivierung entstandenen C5b-7 oder C5b-8 Komplexen

reagiert, während eine solche Anlagerung an zellgebundene Komplexe (auf Schafserythrozyten) nicht erfolgen kann. Aus Kaninchenerythrozyten isolierter MAC, also die ehemals membrangebundene zytolytische Form C5b-9, ist aber durchaus in der Lage S-Protein zu binden (Bhakdi und Trandum-Jensen, 1982b) und dabei den amphiphilen Komplex in ein hydrophiles Makromolekül umzuwandeln. Aufgrund der elektronenmikroskopischen Aufnahmen scheint das S-Protein außen an den Komplex (etwa wie ein Gürtel um die Mitte des Komplexes) gebunden zu sein, also an eine andere Position als beim SC5b-9 Komplex (Podack et al., 1984) nach Aktivierung durch Zymosan in flüssiger Phase. Die Bindungsmöglichkeiten des S-Proteins scheinen nicht auf die metastabile Membranbindungsstelle beschränkt zu sein, eine Untersuchung der räumlichen Anordnung des S-Proteins an dem von Wf8 abdissoziierten MAC ist nicht vorgenommen worden.

Ergänzend dazu sei erwähnt, daß mit isolierten späten Komplementkomponenten (ohne das S-Protein) in flüssiger Phase eine Polymerisation des C9 stattfindet, das Verhältnis von C5b-8 zu C9 dabei etwa 1:7 beträgt (Silversmith und Nelstuen, 1986a), während unter identischen Bedingungen etwa 16 Moleküle C9 an den Komplex binden, wenn dieser an Phospholipidvesikel gebunden ist (Silversmith und Nelstuen, 1986b). Demzufolge hat nicht nur das S-Protein allein einen Einfluß auf die C9 Polymerisation, sondern sie wird auch durch die Bindung an eine Membran beeinflusst. Trotz des

geringeren Grades an C9 Polymerisation im SC5b-9 Komplex ist auch hier mit Hilfe eines monoklonalen α -poly(C9)-Antikörpers eine strukturelle Veränderung des C9 durch Bindung an den C5b-8 Komplex, vergleichbar der Modifikation im membranolytischen MAC, nachgewiesen worden (Mollnes et al., 1985). In beiden Fällen hat offensichtlich derselbe Prozeß stattgefunden.

4.2. Ein neuer Mechanismus der Serumresistenz.

Das identische Serumresistenzverhalten der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten BK-Stämme hat keinen Anlaß gegeben, Unterschiede bei dem der Resistenz zugrundeliegenden Mechanismus zu vermuten. Bereits die ersten Bindungsstudien mit Fluoreszein-markierten Antikörpern und Bakterien nach Präinkubation in NHS haben aber Anhaltspunkte für mindestens zwei unterschiedliche Mechanismen der Serumresistenz, davon einer mit Merkmalen, die mit dem von Joiner et al. (1982a,b) beschriebenen Mechanismus nicht vereinbar sind, gegeben.

In der nachfolgenden Diskussion ist die Klassifizierung der Stämme an den Anfang gestellt worden, weil die weiterführenden Untersuchungen auf dieser Einteilung beruhen und die Experimente in den meisten Fällen zu einer Absicherung der beobachteten Ergebnisse gedient haben.

4.2.1. Gruppeneinteilung der BK-Stämme.

Joiner et al. (1982a,b) ist es gelungen für *Salmonella minnesota* und später (1984b) auch für *E.coli* festzu-

stellen, daß nach der Aktivierung der gesamten Komplementkaskade und der Bildung des MAC, dieser von der Bakterienoberfläche abdissoziiert bzw. nicht dort nachweisbar ist (Kroll et al., 1983, Taylor und Kroll, 1984). Diese Freisetzung des MAC bildet in den genannten Fällen die Grundlage der Serumresistenz. Bei der Untersuchung der BK-Stämme auf ihre C3b-Anlagerung (als Nachweis der Komplementaktivierung durch die Bakterien) kann bei mehr als einem Viertel der Stämme die Komponente C3 nicht nachgewiesen werden.

Weitere Experimente mit dem Regulations-Faktor H und der Komponente C5, die als Bestandteil des MAC die Fortführung der Komplementaktivierung dokumentieren kann, erlauben die Einteilung der BK-Stämme in drei durch ihre Bindungsmuster charakterisierte Gruppen.

- | | |
|------------|---|
| Gruppe I | bindet C3 und C5, während Faktor H entweder überhaupt nicht oder nur bei hohen Serumkonzentrationen nachzuweisen ist. |
| Gruppe II | ist durch das Fehlen der C3- und C5-Bindung charakterisiert. Faktor H läßt sich dagegen schon nach kurzer Inkubationszeit deutlich nachweisen. |
| Gruppe III | scheint eine Besonderheit darzustellen, da hier sowohl C3 als auch der Faktor H unter den gleichen Versuchsbedingungen wie in den vorangegangenen Experimenten angelagert wird. |

Die in dieser Arbeit untersuchten BK-Stämme gehören je zur Hälfte den Gruppen I und II an. Stämme mit dem Bindungsmuster der Gruppe III sind bei den Versuchsreihen nicht berücksichtigt worden.

4.2.2. Komplementbindung und -verbrauch durch die BK-Stämme

Die Ergebnisse für die Gruppe I Bakterien lassen vermuten, daß die Serumresistenz dieser Stämme auf dem erstmals von Joiner et al. (1982a,b) beschriebenen Mechanismus beruht. Mit einigen repräsentativen Vertretern der BK-Stämme der Gruppen I und II ist daher sowohl der Verbrauch und die Anlagerung einzelner Komponenten als auch das Vorhandensein oder die Abwesenheit eines abdissoziierten MAC nachgewiesen worden.

Um die Unterschiede zwischen den Bakterien beider Gruppen deutlicher abzugrenzen, werden die Ergebnisse im folgenden Teil stets gegenübergestellt.

Die Stämme der Gruppen I und II sind zur Absicherung der Klassifizierung auf die Anlagerung der radioaktiv-markierten Komponenten C3 und C6 untersucht worden. In den Versuchen ist C6 anstelle von C5 verwendet worden, weil die erste Komponente des MAC aufgrund der Empfindlichkeit der metastabilen C6-Bindungsstelle für diese Experimente weniger gut geeignet ist.

Alle Stämme der Gruppe I binden erwartungsgemäß C3 und C6. Die Menge der gebundenen Komponenten schwankt in Hinsicht auf C3 stammspezifisch, während von C6 relativ gleiche Mengen angelagert werden. Bei dieser pauschalen Betrachtung der Anlagerung ist allerdings der Stamm BK651 nicht berücksichtigt worden, der im Gegensatz zu der jeweils höchsten Menge eines der anderen Stämme der

Gruppe I die zwei- bis etwa fünffache Menge der Komponenten bindet.

Alle Stämme der Gruppe II binden die radioaktiv-markierten Komponenten C3 und C6. Der fehlende Nachweis einer C3 Bindung durch die Immunfluoreszenz entspricht den Beobachtungen von Van Dijk et al. (1979b). Die Autoren zeigen, daß K-positive Stämme über beide Reaktionswege weniger Komplement als K-negative Bakterien verbrauchen und die Bindung von C3b an die Zellwände der Bakterien mit Hilfe der Immunfluoreszenz nicht nachgewiesen werden kann. Ähnliche Ergebnisse sind in der hier vorgelegten Arbeit erzielt worden. Innerhalb ihrer Schwankungsbreite binden die Gruppe II-Stämme C3 Mengen, die im Durchschnitt etwas niedriger als die für Gruppe I festgestellten Werte liegen, durch die hohe Standardabweichung bei den Stämmen der Gruppe I kann der Unterschied aber nicht als signifikant bezeichnet werden. Bei der Anlagerung von C6 kann für alle Gruppe II-Stämme zusammen ein wesentlich niedrigerer Mittelwert (signifikanter Unterschied) errechnet werden, wobei auch die Standardabweichung geringer ist. Statistisch betrachtet, stellt die Gruppe II mit ihren Werten eine homogenere Einheit als die Gruppe I dar.

Daß trotz der Freisetzung des MAC eine relativ große Menge an C6 auf den Bakterien der Gruppe I festzustellen ist, kann darauf zurückzuführen sein, daß das gemessene C6 vermutlich den Teil der Komponente darstellt, der

gerade zum Zeitpunkt der Probennahme in den sich bildenden Komplexen enthalten ist, die erst nach Anlagerung von C8 und/oder C9 abdissoziieren.

Die Ergebnisse des C3- und C5-Verbrauches, gemessen mit Hilfe eines hämolytischen Tests, stimmen mit den Resultaten der Bindungsstudien überein. Gruppe I Bakterien verbrauchen sowohl C3 als auch C5, wobei die Mengen beider Komponenten für die einzelnen Stämme vergleichbar sind. Die Schwankungsbreiten dieses Testsystems sind nicht so groß wie bei der Anlagerung der radioaktiv-markierten Komponenten. Ähnliches gilt auch für die Verbrauchswerte der Gruppe II Bakterien. Insgesamt betrachtet, wird die C3 Aktivität des mit Bakterien inkubierten Serums zwar nicht so stark reduziert, wie mit Gruppe I Bakterien und die Standardabweichung ist deutlich geringer, der Unterschied ist aber nicht signifikant. Der C5-Verbrauch entspricht für die Gruppe II Bakterien mit geringen Abweichungen dem Kontrollwert (Serum ohne Bakterien inkubiert), die Bakterien verbrauchen signifikant weniger C5.

Die Kinetiken zweier Stämme der Gruppen I und II zeigen, daß bereits innerhalb der ersten zehn Minuten der Inkubation deutliche Unterschiede im C3- bzw. C5-Verbrauch zu beobachten sind. Bei den Stämmen der Gruppe I ist zu diesem Zeitpunkt die Aktivität beider Komponenten bereits auf weniger als 50 % des Ausgangswertes abgesunken, während in der Gruppe II fast kein oder

weniger als 30 % des C3 und nahezu kein C5 verbraucht worden ist. Der darauffolgende weitere Aktivitätsverlust innerhalb der nächsten 20 Minuten ist für die Stämme beider Gruppen recht ähnlich. Daraus läßt sich die Vermutung ableiten, daß die Gruppe II Bakterien im Vergleich mit der Gruppe I entweder schlechtere Aktivatoren des alternativen Reaktionsweges darstellen oder im NHS weniger Antikörper gegen sie vorhanden sind. Der verminderte Verbrauch von C3 in der Anfangsphase der Reaktion kann also zumindest teilweise mit dem alternativen Mechanismus der Serumresistenz in Zusammenhang stehen.

Der Reaktionsweg der Komplementaktivierung stellt daher möglicherweise ein Kriterium für die Gruppenzugehörigkeit eines Bakteriums dar. Aus diesem Grunde ist NHS nach Inkubation mit BK-Stämmen auf die verbleibende Aktivität des klassischen und des alternativen Reaktionsweges bzw. der Komponente C4, als zusätzlichen Beweis für die Aktivierung des klassischen Weges, untersucht worden.

Auch bei diesen Versuchen wird deutlich, daß Bakterien der Gruppe II weniger Komplement verbrauchen als die der Gruppe I. Im Durchschnitt wird die Aktivität (gemessen als CH_{50} und alternativer CH_{50}) nur um 20 bzw. 58 % reduziert (im Gegensatz zu 54 bzw. 78 %). Die Reduktion der Komplementaktivität im Serum ist insgesamt signifikant unterschiedlich und für den alternativen Reaktions-

weg wahrscheinlich signifikant. Der C4-Verbrauch, als Bestätigung der Aktivierung über den klassischen Reaktionsweg, ist für die Gruppe II-Stämme ebenfalls geringer, wenn auch nicht in signifikanter Weise. Die Bakterien beider Gruppen aktivieren sowohl den klassischen als auch den alternativen Reaktionsweg. Es kann daher kein Zusammenhang zwischen dem Gruppentyp und dem Weg der Komplementaktivierung festgestellt werden.

4.2.3. Charakterisierung der BK-Stämme unter besonderer Berücksichtigung der Bakterienoberflächen.

Die Bakterienoberfläche, also die Proteine der äußeren Membran, das LPS und auch die Kapsel, bilden die Angriffspunkte für das Komplementsystem auf dem Bakterium. Diese Strukturen können daher die Interaktion mit einzelnen Komponenten beeinflussen. Die Untersuchungen der Bakterienhülle geben deshalb wesentliche Aspekte für die Beurteilung der Vorgänge während des Komplementangriffs.

Die BK-Stämme sind einer Vielzahl von O-Serotypen zuzuordnen. Zur weiteren Untersuchung immunologischer Eigenschaften sind sie auf den Besitz einer Kapsel untersucht worden. Von den in dieser Arbeit verwendeten BK-Stämmen besitzen die Hälfte der Stämme die K1-Kapsel, dies ist mit zwei unabhängigen Testverfahren nachgewiesen worden. Die Rocketimmunelektrophorese ist dabei eher als Kontrolle der bereits vorliegenden Ergebnisse durch den Phagentest benutzt worden, weil es sich dabei um einen Nachweis mit Hilfe einer Kreuzreaktion

(die Meningokokken B-Kapsel und die E.coli K1-Kapsel sind immunochemisch nahezu identisch Grados und Ewing, 1970, Kasper et al., 1973, Robbins et al., 1974) handelt und Cross et al. (1984b) darauf hinweisen, daß eine Testmethode in vielen Fällen zum Nachweis der Kapsel nicht ausreicht. Die Kombination des Phagentests mit den fünf K1-spezifischen Bakteriophagen (Gross et al., 1977) und die Verwendung einer Anordnung mit polyvalentem Antiserum scheint zur Zeit die bestmögliche Methode darzustellen.

Ohne die Ergebnisse der im nachfolgenden Text diskutierten Versuche vorwegnehmen zu wollen, muß auf die Korrelation zwischen dem Besitz der K1-Kapsel und der Zugehörigkeit zur Gruppe II hingewiesen werden. Von den hier nicht näher untersuchten 53 Ausgangsstämmen besitzen 16 die K1-Kapsel, 2 von 20 in Gruppe I, 12 von 14 in Gruppe II und 2 von 19 in Gruppe III. Bei den für diese Arbeit benutzten BK-Stämmen, die nicht nach dem Kriterium des Kapselbesitzes ausgesucht worden sind, handelt es sich jeweils um 8 typische Vertreter der Gruppe I (ohne K1) und der Gruppe II (mit K1).

Zur Untersuchung der molekularen Verhältnisse der Bakterienoberfläche sind die Proteinmuster der äußeren Membranen auf Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt worden. Gruppenspezifische Merkmale oder Besonderheiten sind nicht festzustellen. Die Muster unterscheiden sich deutlich voneinander, wobei auch Stämme mit gleichem

O-Serotyp (O1) und gleicher Kapsel (K1) keine größere Übereinstimmung aufweisen als Stämme der unterschiedlichen Typen untereinander. Wegen des Fehlens qualitativer Übereinstimmungen bei den Gruppenmitgliedern sind auch quantitative Parameter verglichen worden.

Auf der Basis des Proteingehaltes unterscheiden sich die Mitglieder beider Gruppen innerhalb geringer Schwankungsbreiten nicht voneinander. In Hinblick auf den KDO-Gehalt sind aber Abweichungen festzustellen. Der Mittelwert für die Gruppe I Stämme ist kleiner als bei Gruppe II, wobei die Standardabweichung der Gruppe I geringfügig höher liegt. Der Unterschied kann aber nicht als signifikant bezeichnet werden. In beiden Gruppen weicht jeweils ein Stamm von der Gesamttendenz ab. BK1361 besitzt für Gruppe I einen sehr hohen KDO-Gehalt ($78,5 \mu\text{g}$), während in der Gruppe II für BK658 ein sehr niedriger Wert ($29,5 \mu\text{g}$) gemessen worden ist. Die Zuordnung eines unbekannten Stammes zu einer der Gruppen anhand seines Protein- bzw. KDO-Gehaltes ist nicht möglich, obwohl in Gruppe II wesentlich mehr Stämme hohe KDO-Werte aufweisen.

Der Neuraminsäuregehalt scheint ein besseres Kriterium zur Einstufung eines Stammes in die Gruppe II darzustellen. Wie bereits an anderer Stelle beschrieben, besteht offensichtlich eine Korrelation zwischen dem Besitz der K1-Kapsel (zum großen Teil aus Neuraminsäure bestehend) und der Zugehörigkeit zur Gruppe II. Es

sind zwar einige Ausnahmen gefunden worden, diese bedürfen noch einer näheren Untersuchung. Insgesamt gesehen, besitzen die Stämme der Gruppe II signifikant mehr Neuraminsäure als die Vertreter der Gruppe I.

4.2.4. Mögliche Ursachen des alternativen Mechanismus der Serumresistenz.

Der alternative Mechanismus der Serumresistenz ist durch den Abbruch der Komplementkaskade nach der Aktivierung und Anlagerung der C3 Komponente auf den Bakterien gekennzeichnet. Faktor H bindet an das zellgebundene C3b und wird dabei vermutlich durch die K1-Kapsel der Gruppe II-Stämme positiv beeinflusst. In diesem Zusammenhang gewinnen Veröffentlichungen über eine Korrelation zwischen dem Kapselbesitz und der Serumresistenzeigenschaft neue Bedeutung, obwohl die Ergebnisse recht widersprüchlich sind. In der Arbeit von Glynn et al. (1971) ist zwar der K Antigentyp nicht bestimmt worden, aber der verwendete O-Serotyp O1 ist sehr häufig mit K1 verbunden (nicht so O6 und O75). Die generelle Aussage der Arbeit besteht darin, daß diejenigen Stämme, die über einen hohen K-Antigengehalt verfügen relativ resistent gegenüber der Abtötung durch das Komplementsystem sind.

Für eine Reihe von gut untersuchten E.coli Rauhformen mit K1-Kapsel kann durch den Vergleich des Ausgangsstammes mit seinen kapsellosen Mutanten eine direkte Beziehung zwischen der Serumresistenz und dem Kapsel-

besitz festgestellt werden. Gemski et al. (1980) beobachten, daß die drei rauen K1-produzierenden Parentalstämmen bei Inkubation in mehr als 50 % NHS nicht abgetötet werden, wohingegen alle K1-negativen Mutanten gleichmäßig empfindlich für die bakterizide Wirkung von geringen Serumkonzentrationen sind (alle getesteten Mutanten bei 10 % Serum, ein Stamm bereits bei 1 %). Es sind von den Autoren auch K1-Glattstämmen und ihre K1-negativen Mutanten untersucht worden. Die Ergebnisse sind mit den Resultaten der Rauhstämmen vergleichbar, Abtötung der untersuchten kapsellosen Mutanten ist aber erst bei 20 % Serumkonzentration zu beobachten.

In einigen Arbeiten ist eine große Anzahl von Stämmen auf ihre Sensibilität gegenüber K1-spezifischen und LPS-Rauhform-spezifischen Phagen untersucht worden, so z.B. von Cross et al. (1984a) über 500 klinische Isolate von E.coli (etwa 50 % aus Blutkulturen, etwa 40 % Urinstämme und 10 % Wundabstriche). 12 % der Stämme sind als K1-positive Rauhformen eingestuft worden. Sowohl Cross et al. (1984a) als auch Van Dijk et al. (1979a) können zeigen, daß sowohl die K1-positiven als auch K1-negativen E.coli Stämme aus Blutkulturen resistent gegen die bakterizide Wirkung des Serums sind. Ein direkter Zusammenhang zwischen Kapselbesitz und Serumresistenz ist daher von Van Dijk et al. (1979a) als weniger deutlich bezeichnet worden.

Aus einer Reihe von Veröffentlichungen geht hervor, daß die Kapsel bestenfalls einen geringen Schutz gegen die

Abtötung durch das Komplementsystem liefert. Für K1-Stämme ist diese Schlußfolgerung von Björkstén et al. (1976), Olling (1977) und Bortolussi et al. (1979) gezogen worden. Das Vorhandensein der K1-Kapsel kann nicht als alleinige Ursache für die Serumresistenz angesehen werden. Die in der hier vorliegenden Arbeit in Gruppe I oder Gruppe III eingeordneten serum-resistenten E.coli Stämme weisen eine ebenso große Serumresistenz auf, obwohl nur wenige die K1-Kapsel besitzen. Andere Faktoren eventuell in Verbindung mit der K1-Kapsel scheinen erforderlich, sind aber bislang nicht für die Gruppe II Stämme ermittelt worden. Ob in diesem Zusammenhang die von Orskov et al. (1979) beschriebene O-Azetylierung des Sialinsäuremoleküls von Bedeutung ist, bleibt noch zu untersuchen.

Falls, wie die Ergebnisse mit den Stämmen der Gruppe II andeuten, der alternative Mechanismus der Serumresistenz auf die K1-Kapsel zurückzuführen ist, dann kommt dabei der Wechselwirkung der Sialinsäure mit dem Regulationsfaktor H eine wichtige Funktion zu. Die K1-Kapsel und die isolierten Polysaccharide haben sich sowohl in Tier- als auch bei Freiwilligenversuchen als schwach immunogen erwiesen (Wyle et al., 1972, Kasper et al., 1973, Stevens et al., 1978). Spezifische Antikörper gegen die K1-Kapsel liegen also im NHS, falls überhaupt, nur in geringer Konzentration vor. Stevens et al. (1978) untersuchen mit Hilfe von Phagozytoseexperimenten (mit und ohne EGTA-Zugabe) die Komplementaktivierung einzelner E.coli

K1-Stämme. Aus diesen Versuchen schließen sie, daß die Opsonisierung mit nicht-K1-spezifischen Antikörpern über den klassischen Reaktionsweg erfolgen kann. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Autoren (Björkstén et al., 1976, Stevens et al., 1983), die nur eine schwache Aktivierung durch die K1-Kapsel und zwar über den alternativen Reaktionsweg beobachten können. In der hier vorliegenden Arbeit kann ebenso wie in dem Artikel von Stevens et al. (1978) eine Aktivierung des alternativen Reaktionsweges (gemessen als alternativer CH_{50} -Verbrauch) durch die K1-Stämme der Gruppe II beobachtet werden.

In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß die Sialinsäure der K1-Kapsel als Nichtaktivator des alternativen Reaktionsweges beschrieben worden ist (Stevens et al., 1978, Pluschke et al., 1983, Pluschke und Achtman, 1984), der Verbrauch von Komplementkomponenten auf diesem Wege daher unwahrscheinlich erscheint. Eine Erklärung für diese Beobachtung scheinen die Resultate von Ward et al. (1973) zu liefern. Zwei unterschiedliche Spezies *Serratia marcescens* und ein β -hämolytischer Gruppe A *Streptococcus* setzen Proteasen frei, die zur Spaltung von C3 und C5 führen können. In der flüssigen Phase kommt es also zu einem Komplementverbrauch, der nicht mit einer Bindung der Komponenten an die Bakterien einhergeht.

In den untersuchten Gruppe II-Stämmen kommt es zur Aktivierung des C3 (gemessen als C3-Verbrauch, während

die C5-Aktivität trotz Inkubation mit den Bakterien nicht reduziert wird) und die Komponente kann in radioaktiv-markierter Form auch auf den Bakterien nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse stellt der Verlust an C3-Aktivität durch Inkubation von NHS mit den Gruppe 11-Stämmen einen tatsächlichen Verbrauch der Komponente im Rahmen der Komplementaktivierung dar, ist also nicht auf die Freisetzung von Proteasen zurückzuführen. Das gebundene C3 auf den Bakterien ist aber derart verändert, daß es vom C3-Antiserum im Immunfluoreszenztest nicht mehr erkannt wird. Eine derartige Modifikation und damit verbunden eine erhöhte Sensibilität gegenüber der Anlagerung von Faktor H ist von Nilsson und Nilsson (1986) nach chemischer Veränderung des C3 Moleküls beschrieben worden.

Es ist möglich, daß die K1-Kapsel direkt auf das an sie gebundene C3b einwirkt und dadurch die Bindung des Faktors H an das C3b fördert. Über eine derartige Beeinflussung der Wirkungsweise des Faktors H auf C3 durch die K1-Kapsel sind eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt worden. Nydegger et al. (1978) versuchen anhand von Erythrozyten die Schutzfunktion des K1-Kapselmaterials vor der Komplementaktivierung und den Einfluß auf die Faktor H Bindung zu untersuchen. Mit Hilfe von Mauserythrozyten verschiedener Inzuchtstämme, die sich durch den Sialinsäuregehalt der Membran unterscheiden, kann ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen dem Sialinsäuregehalt und der Fähigkeit den alternativen

Komplementweg zu aktivieren, gefunden werden. Ähnliche Ergebnisse sind bereits von Fearon (1978), Pangburn und Müller-Eberhard (1978) und Kazatchkine et al. (1979) mit enzymatisch oder chemisch veränderten Schafserythrozyten erzielt worden.

Aufgrund der Ergebnisse über die Wechselwirkungen von Sialinsäure und Faktor H kann vermutet werden, daß der alternative Mechanismus der Serumresistenz durch die Blockierung der Amplifikation zustande kommt. C3b bindet an die Sialinsäure der K1-Kapsel, die wiederum erleichtert die Anlagerung von Faktor H, es kommt zu einer Spaltung des initialen C3b und damit zum Abbruch der Komplementaktivierung bei den Gruppe II-Stämmen. Durch die wenigen spezifischen Antikörper im NHS ist auch die Aktivierung über den klassischen Reaktionsweg nur in geringem Maße möglich. In beiden Fällen findet dann vermutlich auch noch eine Blockierung der zellgebundenen C5-Konvertase durch den Faktor H statt.

Zusammenfassend sei noch einmal festgehalten, daß mehr als ein Mechanismus existiert, der für die Serumresistenz von E.coli verantwortlich ist. Die organische Grundlage für diesen alternativen Mechanismus scheint die K1-Kapsel der Gruppe II-Stämme darzustellen. Der Mechanismus beruht auf dem Abbruch der Komplementkaskade auf der C3-Ebene durch Interaktion von Faktor H mit zellgebundenem C3b unter Beteiligung der Sialinsäure der K1-Kapsel. Durch diese Vorgänge kommt es trotz der Akti-

vierung des Komplementsystems durch die Bakterien nicht zu einem "self-assembly" der späten Komplementkomponenten, die Bildung des membranolytischen MAC und damit des eigentlichen Effektormoleküls erfolgt nicht und das Bakterium entgeht so der bakteriziden Wirkung des Serums.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sind nach der Charakterisierung der verwendeten Stämme, also der Wildtypen und ihrer Mutanten einerseits und der BK-Stämme andererseits, die Anlagerung und der Verbrauch der Komponentekomponenten C3, C5 bzw. C6 und Faktor H untersucht worden.

Aufgrund der Ergebnisse ergeben sich zwei typische Bindungsmuster.

Gruppe I: Die Bakterien der Gruppe I aktivieren C3, C5 und C6 und binden sie an ihre Zelloberfläche; Faktor H kann in der Immunfluoreszenz nicht nachgewiesen werden.

Gruppe II: Die Bakterien der Gruppe II verbrauchen ebenfalls C3 (Nachweis auf den Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz nicht möglich). Die Anlagerung kann mit Hilfe der radioaktiv-markierten Komponente sichtbar gemacht werden. Faktor H wird nach kurzer Inkubationszeit in geringer Serumkonzentration gut nachweisbar an die Zellen gebunden. Ein C5 Verbrauch kann nicht oder nur in sehr geringem Maße festgestellt werden, mit der radioaktiv-markierten Komponente C6 ist nur eine schwache Bindung zu beobachten.

Das Bindungsmuster der Gruppe I-Bakterien zeigt die Aktivierung der beiden späten Komplementkomponenten C5 und C6, die zur Bildung eines MAC erforderlich sind. Weil auch die Wildstämme aufgrund ihres Bindungsmusters im Immunfluoreszenztest der Gruppe I zuzuordnen sind, ist ein Teil der Experimente ausschließlich mit ihnen und ihren Mutanten durchgeführt worden.

In einer Reihe von Versuchen sind unter Verwendung von Mangelseren und der Mutante Wf8/2 R6K die für die Abtötung unbedingt erforderlichen Komplementkomponenten aufgezeigt worden. Einen Einblick in die Vorgänge und Faktoren, die dem Mechanismus der Serumresistenz der Gruppe I-Bakterien zugrunde liegen, liefert der Vergleich der isogenen Pärchen in Hinblick auf ihre Oberflächenstrukturen und die Anlagerung radioaktiv-markierter Komponenten. Ein direkter Nachweis für die stoffliche Natur der Serumresistenz kann nicht erbracht werden. Aufgrund der Untersuchungen scheint entweder das LPS oder ein mit der Hämolysin-Sekretion verbundenes Protein die Basis für die fehlende Integration des MAC in die äußere Bakterienmembran und damit für den Resistenzmechanismus durch Freisetzung des MAC darzustellen.

Ein solcher abdissoziierter Komplex kann in den Serumüberständen nach Inkubation mit Bakterien der Gruppe I nachgewiesen werden. Die wichtigsten Ergebnisse der Untersuchung dieses Komplexes und des Zeitpunktes seiner Freisetzung sind nachfolgend aufgeführt.

Diese neuen Aspekte sind:

- die Loslösung des MAC kann auch ohne die vorherige Anlagerung von C9 erfolgen,
- ein Regulationsfaktor, das S-Protein, kann als Bestandteil des abdissoziierten MAC nachgewiesen werden.

Durch die fehlende Aktivierung der Komplementkomponenten C5 und C6 ist bei den Gruppe II-Bakterien die Bildung eines MAC ausgeschlossen. Der Mechanismus, der in diesem Falle der Serumresistenz zugrunde liegt, kann also keinesfalls mit dem der Gruppe I identisch sein. Es handelt sich folglich um einen alternativen, bisher nicht beschriebenen Mechanismus. Vergleiche der Untersuchungen von Gruppe I mit Gruppe II-Stämmen ergeben die folgenden für Gruppe II typischen Kriterien:

- 1) Der Nachweis von bakteriengebundenem C3 ist mit Hilfe der Immunfluoreszenz nicht möglich, C3 wird aktiviert und seine Bindung an die Bakterien kann unter Verwendung der radioaktiv-markierten Komponente nachgewiesen werden.
- 2) Faktor H bindet an die Bakterien.
- 3) C5 Aktivierung und C6 Bindung finden, wenn überhaupt, in sehr geringem Maße statt.
- 4) Der KDO-Gehalt der Stämme ist gegenüber den Vergleichsstämmen erhöht.
- 5) Nahezu alle Stämme besitzen die Neuraminsäurehaltige K1-Kapsel.

Der alternative Mechanismus der Serumresistenz ist auf den Abbruch der Komplementaktivierung auf der C3 Ebene zurückzuführen. Die Faktor H Bindung an das zellgebundene C3 kann die Grundlage für die fehlende Fortführung der Komplementkaskade darstellen. In diesem Zusammenhang kann die Neuraminsäure der K1-Kapsel eine steigernde Wirkung auf die Faktor H-Anlagerung und die nachfolgende Inaktivierung des C3 bzw. der C5 Konvertase besitzen.

6. Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin
CB	Leerwert Zellen
CBC	Leerwert Zellen und Komplement
cfu	Kolonie-bildende Einheit
CH ₅₀	Komplementmenge, die für die Lyse von 50% der Erythrozyten benötigt wird
cpm	Zählimpulse pro Minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Deoxycholat
EA	mit spezifischen Antikörpern beladene Erythrozyten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
ELISA	"enzyme-linked immunosorbent assay"
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
GPS	Meerschweinchenserum
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasenpaar
KDO	2-keto-3-deoxyoctonic acid
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	Membran-Angriffs-Komplex
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
NHS	normales Humanserum
NRS	normales Kaninchenserum
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	NNN'-N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute

7. Literaturverzeichnis

- Achtman M., Heuzenroeder M., Kusecek B., Ochman H., Caugant D., Selander R.K., Väisanen-Rhen V., Korhonen T.K., Stuart S., Orskov F., Orskov I.: Clonal analysis of *Escherichia coli* O2:K1 isolated from diseased humans and animals. *Infect. Immun.* 51, 268-276 (1986)
- Amiguet P., Brunner J., Tschopp J.: The membrane attack complex of complement: lipid insertion of tubular and nontubular polymerized C9. *Biochemistry* 24, 7328-7334 (1985)
- Arroyave C.M., Müller-Eberhard H.J.: Interactions between human C5, C6 and C7 and their functional significance in complement-dependent cytotoxicity. *J. Immunol.* 111, 536-545 (1973)
- Attfield P.V., Pinney R.J.: Involvement of *Escherichia coli* K-12 recombination functions in elimination of multicopy plasmid R6K by DNA-damaging agents. *FEMS Microbiol. Lett.* 28, 287-291 (1985)
- Barry G.T., Abbott V., Tsai T.: Relationship of colominic acid (poly N-acetylneuraminic acid) to bacteria which contain neuraminic acid. *J. Gen. Microbiol.* 29, 335-352 (1962)
- Bartholomew R. M., Esser A.F.: Mechanism of antibody-independent activation of the first component of complement (C1) on retrovirus membranes. *Biochemistry* 19, 2847-2853 (1980)
- Bayer M.E.: Areas of adhesion between wall and membrane of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 53, 395-404 (1968)
- Betz S.J., Isliker H.: Antibody-independent interactions between *Escherichia coli* J 5 and human complement components. *J. Immunol.* 127, 1748-1754 (1981)
- Bhakdi S.: On the molecular nature of the complement lesion. *Behring Inst. Mitt.* 65, 1-15 (1980)
- Bhakdi S., Bhakdi-Lehnen B., Tranum-Jensen J.: Proteolytic transformation of SC5b-9 into an amphiphilic macromolecule resembling the C5b-9 membrane attack complex of complement. *Immunology* 37, 901-912 (1979)
- Bhakdi S., Ey P., Bhakdi-Lehnen B.: Isolation of the terminal complement complex from target sheep erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 419, 445-457 (1976)

- Bhakdi S., Tranum-Jensen J.: Hydrophilic-amphiphilic transition of the terminal SC5b-8 complement complex through tryptic modification: biochemical and ultrastructural studies.
Molec. Immunol. 19, 1167-1177 (1982)a
- Bhakdi S., Tranum-Jensen J.: Terminal membrane C5b-9 complex of human complement: transition from an amphiphilic to a hydrophilic state through binding of the S protein from serum.
J. Cell. Biol. 94, 755-759 (1982)b
- Bhakdi S., Tranum-Jensen J.: On the cause and nature of C9-related heterogeneity of terminal complement complexes generated on target erythrocytes through the action of whole serum.
J. Immunol. 133, 1453-1463 (1984)
- Binns M.M., Davies D.L., Hardy K.G.: Cloned fragments of the plasmid ColV,I-K 94 specifying virulence and serum resistance.
Nature (London) 279, 778-781 (1979)
- Binns M.M., Mayden J., Levine R.P.: Further characterization of complement resistance conferred on E.coli by the plasmid genes traT of R100 and iss of ColV,I-K 94.
Infect. Immun. 35, 654-659 (1982)
- Bjornson A.B., Bjornson H.S.: Activation of complement by opportunist pathogens and chemotypes of Salmonella minnesota.
Infect. Immun. 16, 748-753 (1977)
- Björkstén B., Bortolussi R., Gothefors L., Quie P.G.: Interaction of E.coli strains with human serum: lack of relationship to K1 antigen.
J. Pediatrics 89, 892-897 (1976)
- Bordet J.: Sur le mode d'action des sérums préventifs.
Ann. Inst. Pasteur 10, 193-219 (1896)
- Born J., Bhakdi S.: Does complement kill E.coli by producing transmural pores?
Immunology 59, 139-145 (1986)
- Borsos T., Rapp H.J.: Hemolysin titration based on fixation of the activated first component of complement: evidence that one molecule of hemolysin suffices to sensitize an erythrocyte.
J. Immunol. 95, 559-566 (1965)
- Bortolussi R., Ferrieri P., Björkstén B., Quie P.G.: Capsular K1 polysaccharide of E.coli: relationship to virulence in newborn rats and resistance to phagocytosis.
Infect. Immun. 25, 293-298 (1979)

- Boyle M.D.P., Gee A.P., Borsos T.: Studies on the terminal stages of immune hemolysis. VI. Osmotic blockers differing stokes`radii detect complement-transmembrane channels of differing size.
J. Immunol. 123, 77-82 (1979)
- Brown E.J., Joiner K.A., Gaither T.A., Hammer C.H., Frank M.M.: The interaction of C3b bound to Pneumococci with factor H (β 1H globulin), factor I (C3b/C4b inactivator), and properdin factor B of the human complement system.
J. Immunol. 131, 409-415 (1983)
- Buchner H.: Über die bakterientötende Wirkung des zellfreien Blutserums (I).
Zentralbl. Bakteriologie. 5, 817-823 (1889)a
- Buchner H.: Über die bakterientötende Wirkung des zellfreien Blutserums (II).
Zentralbl. Bakteriologie. 6, 1-11 (1889)b
- Colomb M.G., Bensa J.C., Villier C.L., Arlaud G.J.: Aspects biochimiques de l'activation intrinsèque de C1.
Ann. Immunol. (Paris) 133, C 155 (1982)
- Conrad D.H., Carlo J.R., Ruddy S.: Interaction of β 1H globulin with cell-bound C3b: quantitative analysis of binding and influence of alternative pathway components on binding.
J. Exp. Med. 147, 1792-1805 (1978)
- Cooper N.R.: The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component.
Advances in Immunology 37, 151-216 (1985)
- Cooper N.R., Morrison D.C.: Binding and activation of the first component of human complement by lipid A region of lipopolysaccharides.
J. Immunol. 120, 1862-1869 (1978)
- Cooper N.R., Müller-Eberhard H.J.: The reaction mechanisms of human C5 in immune hemolysis.
J. Exp. Med. 132, 775-793 (1970)
- Coratza G., Molina A.M., Musmanno R.A., Marri L., Margollicci M.A.: Two different types of conjugation-prone recipients for an FII plasmid in populations of an E.coli O26 strain.
Microbiologica 7, 141-150 (1984)
- Cross A.S., Gemski P., Sadoff J.C., Orskov F., Orskov I.: The importance of the K1 capsule in invasive infections caused by Escherichia coli.
J. Infect. Dis. 149, 184-193 (1984)a

- Cross A., Orskov I., Orskov F., Sadoff J., Gemski P.: Identification of *Escherichia coli* K1 antigen. *J. Clin. Microbiol.* 20, 302-304 (1984)b
- Czirók É.: Virulence factors of *Escherichia coli*. II. Antigens O4, O6 and O18, haemolysin production and mannose resistant haemagglutinating capacity are closely associated. *Acta Microbiologica Hungarica* 32, 183-192 (1985)
- Daha M.R., Fearon D.T., Austen K.F.: C3 requirements for formation of alternative pathway C5 convertase. *J. Immunol.* 117, 630-634 (1976)
- Davis S.D., Boatman E.S., Gemsa D., Iannetta A., Wedgwood R.J.: Biochemical and fine structural changes induced in *Escherichia coli* by human serum. *Microbios* 1, 69-86 (1969)
- Davis S.D., Wedgwood R.J.: Kinetics of the bactericidal action of normal serum on gram-negative bacteria. *J. Immunol.* 95, 75-79 (1965)
- DeMatteo C.S., Hammer M.C., Baltch A.L., Smith R.P., Sutphen N.T., Michelsen P.B.: Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to serum bactericidal activity. A comparison of three methods with clinical correlations. *J. Lab. Clin. Med.* 98, 511-518 (1981)
- DiScipio R.G.: The binding of human complement proteins C5, factor B, β 1H and properdin to complement fragment C3b on zymosan. *Biochem. J.* 199, 485-496 (1981)
- DiScipio R.G., Smith C.A., Müller-Eberhard H.J.: The activation of human complement component C5 by a fluid phase C5 convertase. *J. Biol. Chem.* 258, 10629-10636 (1983)
- Edwards M.S., Nicholson-Weller A., Baker C.J., Kasper D.L.: The role of specific antibody in alternative complement pathway-mediated opsonophagocytosis of type III, Group B *Streptococcus*. *J. Exp. Med.* 151, 1275-1287 (1980)
- Fearon D.T.: Regulation by membrane sialic acid of β 1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75, 1971-1975 (1978)
- Fearon D.T., Austen K.F.: Initiation of C3 cleavage in the alternative complement pathway. *J. Immunol.* 115, 1357-1361 (1975)a
- Fearon D.T., Austen K.F.: Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J. Exp. Med.* 142, 856-863 (1975)b

- Fearon D.T., Austen K.F.: Activation of the alternative complement pathway with rabbit erythrocytes by circumvention of the regulatory action of endogenous control proteins.
J. Exp. Med. 146, 22-33 (1977)a
- Fearon D.T., Austen K.F.: Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan-bound amplification convertase to endogenous regulatory mechanisms.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 1683-1687 (1977)b .
- Feingold D.S.: The serum bactericidal reaction. IV. Phenotypic conversion of E.coli from serum-resistance to serum-sensitivity by diphenylamine.
J. Infect. Dis. 120, 437-444 (1969)
- Feingold D.S., Goldman J.N., Kuritz H.M.: Locus of the lethal event in the serum bactericidal reaction.
J. Bacteriol. 96, 2127-2131 (1968)
- Fietta A., Romero E., Siccardi A.G.: Effect of some R factors on the sensitivity of rough Enterobacteriaceae to human serum.
Infect. Immun. 18, 278-282 (1977)
- Fine D.P.: Pneumococcal type-associated variability in alternate complement pathway activation.
Infect. Immun. 12, 772-778 (1975)
- Fraker P.J., Speck J.C.jr.: Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 849-857 (1978)
- Fries L.F., Gaither T.A., Hammer C.H., Frank M.M.: C3b covalently bound to IgG demonstrates a reduced rate of inactivation by factors H and I.
J. Exp. Med. 160, 1640-1655 (1984)
- Gemski P., Cross A.S., Sadoff J.C.: K1 antigen-associated resistance to the bactericidal activity of serum.
FEMS Microbiol. Lett. 9, 193-197 (1980)
- Glynn A.A., Brumfitt W., Howard C.J.: K antigens of E.coli and renal involvement in urinary-tract infections.
The Lancet 7698, 514-516 (1971)
- Glynn A.A., Howard C.J.: The sensitivity to complement of strains of E.coli related to their K antigens.
Immunology 18, 331-346 (1970)
- Goers J.W., Ziccardi R.J., Schumaker V.N., Glovsky M.M.: The mechanism of the first component of complement by univalent hapten - IgG antibody complex.
J. Immunol. 118, 2182-2191 (1977)

- Golan M.D., Burger R., Loos M.: Conformational changes in C1q after binding to immune complexes: detection of neoantigens with monoclonal antibodies.
J. Immunol. 129, 445-447 (1982)
- Goldman R.C., Joiner K., Leive L.: Serum-resistant mutants of *Escherichia coli* O111 contain increased lipopolysaccharide, lack an O antigen-containing capsule, and cover more of their lipid A core with O antigen.
J. Bacteriol. 159, 877-882 (1984)
- Götze O., Müller-Eberhard H.J.: The C3-activator system: an alternate pathway of complement activation.
J. Exp. Med. 134, 90s-108s (1971)
- Götze O., Müller-Eberhard H.J.: The alternative pathway of complement activation.
Adv. Immunol. 24, 1-35 (1976)
- Grabar P., Williams C.A.: Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin.
Biochim. Biophys. Acta 10, 193-194 (1953)
- Grados O., Ewing W.H.: Antigenic relationship between *Escherichia coli* and *Neisseria meningitidis*.
J. Infect. Dis. 122, 100-103 (1970)
- Gross R.J., Cheasty T., Rowe B.: Isolation of bacteriophages specific for the K1 polysaccharide antigen of *Escherichia coli*.
J. Clin. Microbiol. 6, 548-550 (1977)
- Grossman N., Leive L.: Complement activation pathway by purified *Salmonella* lipopolysaccharide is affected by its structure but not its O-antigen length.
J. Immunol. 132 376-385 (1984)
- Hacker J., Hughes C., Hof H., Göbel W.: Cloned hemolysin genes from *E. coli* that cause urinary tract infection determine different levels of toxicity in mice.
Infect. Immun. 42, 57-63 (1983)b
- Hacker J., Knapp S., Göbel W.: Spontaneous deletions and flanking regions of the chromosomally inherited hemolysin determinant of an *E. coli* O6 strain.
J. Bacteriol. 154, 1145-1152 (1983)a
- Hammer C.H., Abramovitz A.S., Mayer M.M.: A new activity of complement component C3: cell-bound C3b potentiates lysis of erythrocytes by C5b,6 and terminal components.
J. Immunol. 117, 830-834 (1976)

- Harriman G.R., Esser A.F., Podack E.R., Wunderlich A.C., Braude A.I., Lint T.F., Curd J.G.: The role of C9 in complement-mediated killing of *Neisseria*.
J. Immunol. 127, 2386-2390 (1981)
- Harriman G.R., Podack E.R., Braude A.I., Corbeil L.C., Esser A.F., Curd J.G.: Activation of complement by serum-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. Assembly of the membrane attack complex without subsequent cell death.
J. Exp. Med. 156, 1235-1249 (1982)
- Härtlein M., Schießl S., Wagner W., Rdest U., Kreft J., Goebel W.: Transport of hemolysin by *Escherichia coli*.
J. Cell. Biochem. 22, 87-97 (1983)
- Hawkes R., Niday E., Gordon J.: A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies.
Anal. Biochem. 119, 142-147 (1982)
- Hill A.W., Shears A.L., Hibbitt K.G.: The requirement of specific antibody for the killing of *E.coli* by the alternate complement pathway in bovine serum.
Immunology 34, 131-136 (1978)
- Howard C.J., Glynn A.A.: Some physical properties of K antigens of *E.coli* related to their biological activity.
Infect. Immun. 4, 6-11 (1971)a
- Howard C.J., Glynn A.A.: The virulence for mice of strains of *E.coli* related to the effects of K antigens on their resistance to phagocytosis and killing by complement.
Immunology 20, 767-777 (1971)b
- Inoue K.: Immune bacteriolytic and bactericidal reactions.
In: Research in Immunochemistry and Immunobiology Vol. 1 (Kwapinski J.B.G., ed.) University Park Press pp. 177-222 (1972)
- Inoue K., Kinoshita T., Okada M., Akiyama Y.: Release of phospholipids from complement-mediated lesions on the surface of *Escherichia coli*.
J. Immunol. 119, 65-72 (1977)
- Inoue K., Takamizawa A., Kurimura T., Yonemasu K.: Studies on the immune bacteriolysis. XIII. Leakage of enzymes from *Escherichia coli* during immune bacteriolysis.
Biken J. 11, 193-201 (1968)
- Inoue K., Takamizawa A., Yano K.-I., Amano T.: Chemical studies on damages of *Escherichia coli* by the immune bactericidal reaction. I. Release and degradation of phospholipids from damaged bacteria.
Biken J. 17, 127-134 (1974)

- Iseman D.E., Podack E.R., Cooper N.R.: The interaction of C5 with C3b in free solution: a sufficient condition for cleavage by a fluid phase C3/C5 convertase.
J. Immunol. 124, 326-331 (1980)
- Ito S., Tamura N.: Inhibition of classical C5 convertase in the complement system by factor H.
Immunology 50, 631-635 (1983)
- Jasin H.E.: Human heat labile opsonins: evidence for their mediation via the alternative pathway of complement activation.
J. Immunol. 109, 26-31 (1972)
- Joiner K.A., Brown E.J., Frank M.M.: Complement and bacteria: chemistry and biology in host defense.
Ann. Rev. Immunol. 2, 461-491 (1984)b
- Joiner K., Brown E., Hammer C., Warren K., Frank M.: Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. III. C5b-9 deposits stably on rough and type 7 S. pneumoniae without causing bacterial killing.
J. Immunol. 130, 845-849 (1983)a
- Joiner K.A., Fries L.F., Schmetz M.A., Frank M.M.: IgG bearing covalently bound C3b has enhanced bactericidal activity for Escherichia coli O111.
J. Exp. Med. 162, 877-889 (1985)a
- Joiner K.A., Goldman R.C., Hammer C.H., Leive L., Frank M.M.: Studies of the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. V. IgG and F(ab')₂ mediate killing of E.coli O111B4 by the alternative complement pathway without increasing C5b-9 deposition.
J. Immunol. 131, 2563-2569 (1983)c
- Joiner K.A., Goldman R.C., Hammer C.H., Leive L., Frank M.M.: Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. VI. IgG increase the bactericidal efficiency of C5b-9 for E.coli O111B4 by acting at a step before C5 cleavage.
J. Immunol. 131, 2570-2575 (1983)d
- Joiner K.A., Grossman N., Schmetz M., Leive L.: C3 binds preferentially to long-chain lipopolysaccharides during alternative pathway activation by Salmonella montevideo.
J. Immunol. 136, 710-715 (1986)

- Joiner K.A., Hammer C.H., Brown E.J., Cole R.J., Frank M.M.: Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. I. Terminal complement components are deposited and released from *Salmonella minnesota* S218 without causing bacterial death. *J. Exp. Med.* 155, 797-808 (1982)a
- Joiner K.A., Hammer C.H., Brown E.J., Frank M.M.: Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. II. C8 and C9 release C5b67 from the surface of *Salmonella minnesota* S218 because the terminal complex does not insert into the bacterial outer membrane. *J. Exp. Med.* 155, 809-819 (1982)b
- Joiner K.A., Schmetz M.A., Goldman R.C., Leive L., Frank M.M.: Mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing: inserted C5b-9 correlates with killing for *Escherichia coli* O111B4 varying in O-antigen capsule and O-polysaccharide coverage of lipid A core oligosaccharide. *Infect. Immun.* 45, 113-117 (1984)a
- Joiner K.A., Schmetz M.A., Sanders M.E., Murray T.G., Hammer C.H., Dourmashkin R., Frank M.M.: Multimeric complement component C9 is necessary for killing of *Escherichia coli* J5 by terminal attack complex C5b-9. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82, 4808-4812 (1985)b
- Joiner K.A., Warren K.A., Hamer C., Frank M.M.: Bactericidal but not nonbactericidal C5b-9 is associated with distinctive outer membrane proteins in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Immunol.* 134, 1920-1925 (1985)c
- Kabat E.A., Mayer M.M.: Complement and complement fixation. In: *Experimental Immunochemistry*, E.A. Kabat and M.M. Mayer, Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Ill. USA, Chapt. 4, 133-240 (1961)
- Kanukollu U., Bieler S., Hull S., Hull R.: Contribution of the traT gene to serum resistance among clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *J. Med. Microbiol.* 19, 61-67 (1985)
- Kasper D.L., Winkelhake J.L., Zollinger W.D., Brandt B.L., Artenstein M.S.: Immunochemical similarity between polysaccharide antigens of *Escherichia coli* O7:K1(L).NM and group B *Neisseria meningitidis*. *J. Immunol.* 110: 262-268 (1973)

- Kazatchkine M.D., Fearon D.T., Austen K.F.: Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and β 1H for cell-bound C3b.
J. Immunol. 122, 75-81 (1979)
- Kinoshita T., Hong K., Inoue K.: C9 hemolytic activity of the soluble C5b-9 complex of guinea pig complement, analogous to human SC5b-9.
J. Immunol. 123, 1989-1995 (1979)
- Kolb W.P., Haxby J.A., Arroyave C.M., Müller-Eberhard H.J.: The membrane attack mechanism of complement. Reversible interactions among the five native components in free solution.
J. Exp. Med. 138, 428-437 (1973)
- Kolb W.P., Müller-Eberhard H.J.: The membrane attack mechanism of complement. Verification of a stable C5-9 complex in free solution.
J. Exp. Med. 138, 438-451 (1973)
- Kolb W.P., Müller-Eberhard H.J.: The membrane attack mechanism of complement. Isolation and subunit composition of the C5b-9 complex.
J. Exp. Med. 141, 724-735 (1975)
- Kontomichalou P., Mitani M., Clowes R.C.: Circular R-factor molecules controlling penicillinase synthesis, replicating in *Escherichia coli* under either relaxed or stringent control.
J. Bacteriol. 104, 34-44 (1970)
- Kroll H.-P., Bhakdi S., Taylor P.W.: Membrane changes induced by exposure of *E.coli* to human serum.
Infect. Immun. 42, 1055-1066 (1983)
- Kroll H.-P., Voigt W.-H., Taylor P.W.: Stable insertion of C5b-9 complement complexes into the outer membrane of serum treated, susceptible *Escherichia coli* cells as a prerequisite for killing.
Zbl. Bakt. Hyg. A 258, 316-326 (1984)
- Lachmann P.J.: An evolutionary view of the complement system.
Behring Inst. Mitteilungen 63, 25-32 (1979)
- Lachmann P.J., Hughes-Jones N.C.: Initiation of complement activation.
Springer Sem. Immunopathol. 7, 143-162 (1984)
- Lepow I.H., Naff G.B., Todd E.W., Pensky J., Hinz C.F.jr.: Chromatographic resolution of the first component of human complement into three activities.
J. Exp. Med. 117, 983-1008 (1963)

- Lesavre P.H., Müller-Eberhard H.J.: Mechanism of action of factor D of the alternative complement pathway. *J. Exp. Med.* 148, 1498-1509 (1978)
- Lint T.F., Zeitz H.J., Gewurz H.: Inherited deficiency of the ninth component of complement in man. *J. Immunol.* 125, 2252-2257 (1980)
- Loos M.: The classical complement pathway: mechanism of activation of the first component by antigen-antibody complexes. *Prog. Allergy* 30, 135-192 (1982)
- Loos M.: The complement system: activation and control. In: *Bacteria and complement*, M. Loos (ed.) Springer Verlag pp. 7-18 (1985)
- Loos M., Bitter-Suermann D., Dierich M.: Interaction of the first (C1) and the second (C2) and the fourth (C4) component of complement with different preparations of bacterial lipopolysaccharides and with lipid A. *J. Immunol.* 112, 935-940 (1974)
- Loos M., Wellek B., Thesen R., Opferkuch W.: Antibody-independent interaction of the first component of complement with gram-negative bacteria. *Infect. Immun.* 22, 5-9 (1978)
- Markwell M.A.K., Haas S.M., Bieber L.L., Tolbert N.E.: A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87, 206-210 (1978)
- Martinez R.J., Carroll S.F.: Sequential metabolic expressions of the lethal process in human serum-treated *Escherichia coli*: role of lysozyme. *Infect. Immun.* 28, 735-745 (1980)
- Medicus R.G., Esser A.F., Fernandez H.N., Müller-Eberhard H.J.: Native and activated properdin: interconvertibility and identity of amino- and carboxy-terminal sequences. *J. Immunol.* 124, 602-606 (1980)
- Medicus R.G., Götze O., Müller-Eberhard H.J.: Alternative pathway of complement: recruitment of precursor properdin by the labile C3/C5 convertase and the potentiation of the pathway. *J. Exp. Med.* 144, 1076-1093 (1976)a
- Medicus R.G., Schreiber R.D., Götze O., Müller-Eberhard H.J.: A molecular concept of the properdin pathway. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 612-616 (1976)b

- Molina A.M., Coratza G., Margollicci M.A., Marri L., Musmanno R.A.: Properties of an E.coli O26 mutant with modified cell wall and improved efficiency as recipient in conjugation for an FII plasmid. *Microbiologica* 7, 203-208 (1984)
- Moll A., Cabello F., Timmis K.N.: Rapid assay for the determination of bacterial resistance to the lethal activity of serum. *FEMS Microbiol. Letters* 6, 273-276 (1979)
- Moll A., Manning P.A., Timmis K.N.: Plasmid-determined resistance to serum bactericidal activity: a major outer membrane protein, the traI gene product, is responsible for plasmid-specified serum resistance in E.coli. *Infect. Immun.* 28, 359-367 (1980)
- Mollnes T.E., Lea T., Harboe M., Tschopp J.: Monoclonal antibodies recognizing a neoantigen of poly(C9) detect the human terminal complement complex in tissue and plasma. *Scand. J. Immunol.* 22, 183-195 (1985)
- Monahan J.B., Sodetz J.M.: Binding of the eighth component of human complement to the soluble cytolytic complex is mediated by its β subunit. *J. Biol. Chem.* 255, 10579-10582 (1980)
- Monahan J.B., Sodetz J.M.: Role of the β -subunit in the interaction of the eighth component of human complement with the membrane bound cytolytic complex. *J. Biol. Chem.* 256, 3258-3262 (1981)
- Morgan B.P., Imagawa D.K., Dankert J.R., Ramm L.E.: Complement lysis of U937, a nucleated mammalian cell line in the absence of C9: effect of C9 on C5b-8 mediated cell lysis. *J. Immunol.* 136, 3402-3406 (1986)
- Morrison D.C., Kline L.F.: Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J. Immunol.* 118, 362-368 (1977)
- Müller-Eberhard H.J.: The membrane attack complex. *Springer Sem. Immunopathol.* 7, 93-141 (1984)
- Müller-Eberhard H.J.: The killer molecule of complement. *J. Invest. Dermatology* 85, 47s-52s (1985)
- Müller-Eberhard H.J.: The membrane attack complex of complement. *Ann Rev. Immunol.* 4, 503-528 (1986)
- Müller-Eberhard H.J., Götze O.: C3 proactivator convertase and its mode of action. *J. Exp. Med.* 135, 1003-1008 (1972)

- Naff G.B., Ratnoff O.D.: The enzymatic nature of C₁r conversion of C₁s to C₁ esterase and digestion of amino acid esters by C₁r.
J. Exp. Med. 128, 571-593 (1968)
- Nagaki K., Iida K., Okubo M., Inai S.: Reaction mechanisms of 81H globulin.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 57, 221-232 (1978)
- Nelson B.W., Roantree R.J.: Analyses of lipopolysaccharides extracted from penicillin-resistant, serum-sensitive Salmonella mutants.
J. Gen. Microbiol. 48, 179-188 (1967)
- Nicholson A., Brade V., Schorlemmer H.U., Burger R., Bitter-Suermann D., Hadding U.: Interaction of C3b, B, and D in the alternative pathway of complement activation.
J. Immunol. 115, 1108-1113, (1975)
- Nilius A.M., Savage D.C.: Serum resistance encoded by colicin V plasmids in Escherichia coli and its relationship to the plasmid transfer system.
Infect. Immun. 43, 947-953 (1984)
- Nilsson B., Nilsson U.R.: Antigens of complement factor C3 involved in the interactions with factors I and H.
Scand. J. Immunol. 23, 357-363 (1986)
- Noegel A., Rdest U., Goebel W.: Determination of the functions of hemolytic plasmid pHly152 of Escherichia coli.
J. Bacteriol. 145, 233-247 (1981)
- Noegel A., Rdest U., Springer W., Goebel W.: Plasmid cistrons controlling synthesis and excretion of the exotoxin α -hemolysin of E.coli.
Mol. Gen. Genet. 175, 343-350 (1979)
- Nutall G.: Experimente über die bakterienfeindlichen Einflüsse des thierischen Körpers.
Z. Hyg. Infektionskr. 4, 353-394 (1888)
- Nydegger U.E., Fearon D.T., Austen K.F.: Autosomal locus regulates inverse relationships between sialic acid content and capacity of mouse erythrocytes to activate human alternative complement pathway.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 6078-6082 (1978)
- Ogata R.T., Levine R.P.: Characterization of complement resistance in E.coli conferred by the antibiotic resistance plasmid R 100.
J. Immunol. 125, 1494-1498 (1980)
- Ogata R.T., Winters C., Levine R.P.: Nucleotide sequence analysis of the complement resistance gene from plasmid R 100.
J. Bacteriol. 151, 819-827 (1982)

- Olling S.: Sensitivity of gram-negative bacilli to the serum bactericidal activity: a marker of the host-parasite relationship in acute and persisting infections.
Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 10, 1-40 (1977)
- Opal S., Cross A., Gemski P.: K antigen and serum sensitivity of rough E.coli.
Infect. Immun. 37, 956-960 (1982)
- Orskov F., Orskov I., Sutton A., Schneerson R., Lin W., Egan W., Haff G.E., Robbins J.B.: Form variation in Escherichia coli K1: determined by O-acetylation of the capsular polysaccharide.
J. Exp. Med. 149, 669-685 (1979)
- Pangburn M.K., Morrison D.C., Schreiber R.D., Müller-Eberhard H.J.: Activation of the alternative complement pathway: recognition of surface structures on activators by bound C3.
J. Immunol. 124, 977-982 (1980)
- Pangburn M.K., Müller-Eberhard H.J.: Complement C3 convertase: cell surface restriction of β 1H control and generation of restriction on neuraminidase-treated cells.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 2416-2420 (1978)
- Pangburn M.K., Müller-Eberhard H.J.: Relation of a putative thioester bond in C3 to activation of the alternative pathway and the binding of C3b to biological targets of complement.
J. Exp. Med. 152, 1102-1114 (1980)
- Pangburn M.K., Müller-Eberhard H.J.: Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3.
J. Exp. Med. 154, 856-867 (1981)
- Pangburn M.K., Schreiber R.D., Müller-Eberhard H.J.: Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for serum protein β 1H for cleavage of C3b and C4b in solution.
J. Exp. Med. 146, 257-270 (1977)
- Pangburn M.K., Schreiber R.D., Müller-Eberhard H.J.: Molecular interactions of the control proteins C3b inactivator and β 1H with various complement intermediates.
J. Immunol. 120, 1791 (Abstract) (1978)
- Pillemer L., Schönberg M.D., Blum L., Wurz L.: Properdin system and immunity. II. Interaction of the properdin system with polysaccharides.
Science 122, 5453-5457 (1955)

- Pluschke G., Achtman M.: Degree of antibody-independent activation of the classical complement pathway by K1 *Escherichia coli* differs with O antigen type and correlates with virulence of meningitis in newborns.
Infect. Immun. 43, 684-692 (1984)
- Pluschke G., Mayden J., Achtman M., Levine R.P.: Role of the capsule and the O antigen in resistance of O18:K1 *E. coli* to complement-mediated killing.
Infect. Immun. 42, 907-913 (1983)
- Podack E.R.: Molecular composition of the tubular structure of the membrane attack complex of complement.
J. Biol. Chem. 259, 8641-8647 (1984)
- Podack E.R., Biesecker G., Kolb W.P., Müller-Eberhard H.J.: The C5b-6 complex: reaction with C7, C8, C9.
J. Immunol. 121, 484-490 (1978)b
- Podack E.R., Halverson C., Esser A.F., Kolb W.P., Müller-Eberhard H.J.: SC5b-9: regeneration of the ability to interact with lipid by selective removal of the S-protein.
J. Immunol. 120, 1792 (Abstract) (1978)a
- Podack E.R., Kolb W.P., Müller-Eberhard H.J.: The C5b-9 complex: subunit composition of the classical and alternative pathway-generated complex.
J. Immunol. 116, 1431-1434 (1976)
- Podack E.R., Kolb W.P., Müller-Eberhard H.J.: The SC5b-7 complex: formation, isolation, properties, and subunit composition.
J. Immunol. 119, 2024-2029 (1977)
- Podack E.R., Müller-Eberhard H.J.: SC5b-9 complex of complement: formation of the dimeric membrane attack complex by removal of S-protein.
J. Immunol. 124, 1779-1783 (1980)
- Podack E.R., Preissner K.T., Müller-Eberhard H.J.: Inhibition of C9 polymerization within the SC5b-9 complex of complement by S-protein.
Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C Suppl. 284, 89-96 (1984)
- Podack E.R., Tschopp J.: Membrane attack by complement.
Molec. Immunol. 21, 589-603 (1984)
- Podack E.R., Tschopp J., Müller-Eberhard H.J.: Molecular organisation of C3 within the membrane attack complex of complement: induction of circular C9 polymerization by the C5b-8 assembly.
J. Exp. Med. 156, 268-282 (1982)

- Preissner K.T., Podack E.R., Müller-Eberhard H.J.: The membrane attack complex of complement: relation of C7 to the metastable membrane binding site of the intermediate complex C5b-7.
J. Immunol. 135, 445-451 (1985a)
- Preissner K.T., Podack E.R., Müller-Eberhard H.J.: Self-association of the seventh component of human complement (C7): dimerization and polymerization.
J. Immunol. 135, 452-458 (1985b)
- Ramm L.E., Whitlow M.B., Mayer M.M.: The relationship between channel size and the number of C9 molecules in the C5b-9 complex.
J. Immunol. 134, 2594-2599 (1985)
- Reynard A.M., Beck M.E.: Plasmid-mediated resistance to the bactericidal effects of normal rabbit serum.
Infect. Immun. 14, 848-850 (1976)
- Reynard A.M., Beck M.E., Cunningham R.K.: Effects of antibiotic resistance plasmids on the bactericidal activity of normal rabbit serum.
Infect. Immun. 19, 861-866 (1978)
- Robbins J.B., McCracken G.H.jr., Gotschlich E.C., Orskov F., Orskov I., Hanson L.A.: Escherichia coli K1 capsular polysaccharide associated with neonatal meningitis.
New Engl. J. Med. 290, 1216-1220 (1974)
- Root R.K., Ellman L., Frank M.M.: Bactericidal and opsonic properties of C4-deficient guinea pig serum.
J. Immunol. 109, 477-486 (1972)
- Rowley D.: Sensitivity of rough gram-negative bacteria to the bactericidal action of serum.
J. Bacteriol. 95, 1647-1650 (1968)
- Rowley D., Wardlaw A.C.: Lysis of gram-negative bacteria by serum.
J. Gen. Microbiol. 18, 529-533 (1958)
- Sansano M.jr., Reynard A.M., Cunningham R.K.: Inhibition of serum bactericidal reaction by lipopolysaccharide.
Infect. Immun. 48, 759-762 (1985)
- Schreiber R.D., Morrison D.C., Podack E.R., Müller-Eberhard.: Bactericidal activity of the alternative complement pathway generated from 11 isolated plasma proteins.
J. Exp. Med. 149, 870-882 (1979)
- Schreiber R.D., Müller-Eberhard H.J.: Assembly of the cytolytic alternative pathway of complement from 11 isolated plasma proteins.
J. Exp. Med. 148, 1722-1727 (1978)

- Schreiber R.D., Pangburn M.K., Lesavre P.H., Müller-Eberhard H.J.: Initiation of the alternative pathway of complement: Recognition of activators by bound C3b and assembly of the entire pathway from six isolated proteins.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 3948-3952 (1978)
- Schreiber R.D., Pangburn M.K., Medicus R.G., Müller-Eberhard H.J.: Raji cell injury and subsequent lysis by the purified cytolytic alternative pathway of human complement,
Clin. Immunol. Immunopathol. 15, 384-396 (1980)
- Siegel R.C., Schumaker V.N., Poon P.H.: Stoichiometry and sedimentation properties of the complex formed between the C1q and C1r₂C1s₂ subcomponents of the first component of complement.
J. Immunol. 127, 2447-2452 (1981)
- Silversmith R.E., Nelstuen G.L.: Fluid-phase assembly of the membrane attack complex of complement.
Biochemistry 25, 841-851 (1986a)
- Silversmith R.E., Nelstuen G.L.: Assembly of the membrane attack complex of complement on small unilamellar phospholipid vesicles.
Biochemistry 25, 852-860 (1986b)
- Sirota L., Inoue K., Okada M., Amano T.: Immune bactericidal reactions by guinea-pig gamma-1 and gamma-2 antibodies.
Immunology 30, 435-441 (1976)
- Smith H.W.: A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of E.coli: the discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated, or identical with colicine V.
J. Gen. Microbiol. 83, 95-111 (1974)
- Southern E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975)
- Stephens C.G., Williams R.C. jr., Reed W.P.: Classical and alternative complement pathway activation by Pneumococci.
Infect. Immun. 17, 296-302 (1977)
- Stevens P., Huang S.N.-Y., Welch W.D., Young L.S.: Restricted complement activation by E.coli with the K-1 capsular serotype: a possible role in pathogenicity.
J. Immunol. 121, 2174-2180 (1978)
- Stevens P., Young L.S., Adamu S.: Opsonization of various capsular (K) E.coli by the alternative complement pathway.
Immunology 50, 497-502 (1983)

- Stolfi R.L.: Immune lytic transformation: a state of irreversible damage generated as a result of the reaction of the eighth component in the guinea pig complement system.
J. Immunol. 100, 46-54 (1968)
- Svendsen P.J., Weeke B., Johansson B.-G.: Chemicals, solutions, equipment and general procedures.
In: Handbook of Immunoprecipitation-in-Gel Techniques, N.H. Axelsen (ed.), Blackwell Scientific Publications
Scand. J. Immunol. 17, Suppl. 10, 3-20 (1983)
- Tarr P.I., Hosea S.W., Brown E.J., Schneerson R., Sutton A., Frank M.M.: The requirement of specific anticapsular IgG for killing of Haemophilus influenzae by the alternative pathway of complement activation.
J. Immunol. 128, 1772-1775 (1982)
- Taylor P.W.: Immunochemical investigations on lipopolysaccharides and acidic polysaccharides from serum-sensitive and serum-resistant strains of E.coli isolated from urinary-tract infections.
J. Med. Microbiol. 9, 405-421 (1976)
- Taylor P.W., Kroll H.-P.: Killing of an encapsulated strain of E.coli by human serum.
Infect. Immun. 39, 122-131 (1983)
- Taylor P.W., Kroll H.-P.: Interaction of human complement proteins with serum-sensitive and serum-resistant strains of Escherichia coli.
Molec. Immunol. 21, 609-620 (1984)
- Tenner A.J., Ziccardi R.J., Cooper N.R.: Antibody independent C1 activation by E.coli.
J. Immunol. 133, 886-891 (1984)
- Tesh V.L., Duncan R.L.jr., Morrison D.C.: The interaction of Escherichia coli with normal human serum: the kinetics of serum-mediated lipopolysaccharide release and its dissociation from bacterial killing.
J. Immunol. 137, 1329-1335 (1986)
- Timmis K.N., Boulnois G.J., Bitter-Suermann D., Cabello F.C.: Surface components of Escherichia coli that mediate resistance to the bactericidal activities of serum and phagocytes.
In: Current Topics in Microbiology and Immunology 118, Genetic approaches to microbial pathogenicity W. Goebel (ed.)
Springer-Verlag pp. 197-218 (1985)

- Timmis K.N., Manning P.A., Echarti C., Timmis J.K., Moll A.: Serum resistance in *E.coli*.
In Molecular biology, pathogenicity and ecology of bacterial plasmids, S.B. Levy, R.C. Clowes, E.L. Koenig (eds), Plenum Publishing Corp. New York, 133-144 (1981)
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354 (1979)
- Tschopp J.: Ultrastructure of the membrane attack complex of complement. Heterogeneity of the complex caused by different degree of C9 polymerization.
J. Biol. Chem. 259, 7857-7863 (1984)
- Tschopp J., Engel A., Podack E.R.: Molecular weight of poly(C9). 12 to 18 C9 molecules form the trans-membrane channel of complement.
J. Biol. Chem. 259, 1922-1928 (1984)
- Tschopp J., Esser A.F., Spira T.J., Müller-Eberhard H.J.: Occurrence of an incomplete C8 molecule in homozygous C8 deficiency in man.
J. Exp. Med. 154, 1599-1607 (1981)
- Tschopp J., Podack E.R., Müller-Eberhard H.J.: The membrane attack complex of complement: C5b-8 complex as accelerator of C9 polymerization.
J. Immunol. 134, 495-499 (1985)
- Van Dijk W.C., Verbrugh H.A., Peters R., Van der Tol M.E., Peterson P.K., Verhoef J.: *E.coli* K antigen in relation to serum-induced lysis and phagocytosis.
J. Med. Microbiol. 12, 123-130 (1979)a
- Van Dijk W.C., Verbrugh H.A., Van der Tol M.E., Peters R., Verhoef J.: Role of *E.coli* K capsular antigens during complement activation, C3 fixation, and opsonization.
Infect. Immun. 25, 603-609 (1979)b
- Väisänen-Rhen V., Elo J., Väisänen E., Siitonen A., Orskov I., Orskov F., Svenson S.B., Mäkelä H., Korhonen T.K.: P-fimbriated clones among uropathogenic *E.coli* strains.
Infect. Immun. 43, 149-155 (1984)
- Vann W.F., Jann K.: Structure and serological specificity of the K13-antigenic polysaccharide (K13 antigen) of urinary tract-infective *E.coli*.
Infect. Immun. 25, 85-92 (1979)

- Vogt W., Dames W., Schmidt G., Dieminger L.: Complement activation by the properdin system: formation of a stoichiometric C3 clearing complex of properdin factor B with C3b.
Immunochemistry 14, 201-205 (1977)
- Vogt W., Schmidt G., von Buttlar B., Dieminger L.: A new function of the activated third component of complement: binding to C5, an essential step for C5 activation.
Immunology 34, 29-40 (1978)
- Vukajlovich S.W.: Antibody-independent activation of the classical pathway of human serum complement by lipid A is restricted to Re-chemotype lipopolysaccharide and purified lipid A.
Infect. Immun. 53, 480-485 (1986)
- Wagner W., Vogel M., Goebel W.: Transport of hemolysin across the outer membrane of *Escherichia coli* requires two functions.
J. Bacteriol. 154, 200-210 (1983)
- Ward P.A., Chapitis J., Conroy M.C., Lepow I.H.: Generation by bacterial proteinases of leukotactic factors from human serum, and human C3 and C5.
J. Immunol. 110, 1003-1009 (1973)
- Wardlaw A.C.: The complement-dependent bacteriolytic activity of normal human serum. II. Cell wall composition of sensitive and resistant strains.
Can. J. Microbiol. 9, 41-52 (1963)
- Ware C.F., Wetsel R.A., Kolb W.P.: Physicochemical characterization of fluid phase (SC5b-9) and membrane derived (MC5b-9) attack complexes of human complement purified by immuno-absorbent affinity chromatography or selective detergent extraction.
Mol. Immunol. 18, 521-531 (1981)
- Weiler J.M., Daha M.R., Austen K.F., Fearon D.T.: Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein β 1H.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 3268-3272 (1976)
- Wettstein M., Höpfl D., Kubens B., Opferkuch W.: A new mechanism of serum resistance in *Escherichia coli*.
Zbl. Bakt. Hyg. A 262, 259-260 (Abstract) (1986)
- Whaley K., Ruddy S.: Modulation of C3b hemolytic activity by a plasma protein distinct from C3b inactivator.
Science 193, 1011-1013 (1976)a
- Whaley K., Ruddy S.: Modulation of the alternative complement pathway by β 1H globulin.
J. Exp. Med. 144, 1147-1163 (1976)b

- Whitlow M.B., Ramm L.E., Mayer M.M.: Penetration of C8 and C9 in the C5b-9 complex across the erythrocyte membrane into the cytoplasmic space.
J. Biol. Chem. 260, 998-1005 (1985)
- Wiedmer T., Sims P.J.: Effect of complement proteins C5b-9 on blood platelets. Evidence for reversible depolarization of membrane potential.
J. Biol. Chem. 260, 8014-8019 (1985)
- Wilson L.A., Spitznagel J.K.: Characteristics of complement-dependent release of phospholipid from E.coli.
Infect. Immun. 4, 23-28 (1971)
- Winkelstein J.A., Bocchini J.A. jr., Schiffman G.: The role of the capsular polysaccharide in the activation of the alternative pathway by the Pneumococcus.
J. Immunol. 116, 367-370 (1976)
- Winkelstein J.A., Shin H.S.: The role of immunoglobulin in the interaction of Pneumococci and the properdin pathway: evidence for its specificity and lack of requirement for the Fc portion of the molecule.
J. Immunol. 112, 1635-1642 (1974)
- Winkelstein J.A., Shin H.S., Wood W.B.: Heat labile opsonins to Pneumococcus. III. The participation of immunoglobulin and of the alternate pathway of C3 activation.
J. Immunol. 108, 1681-1689 (1972)
- Wretling B., Becker K., Haas D.: IncP-1 R plasmids decrease the serum resistance and the virulence of Pseudomonas aeruginosa.
J. Gen. Microbiol. 131, 2701-2704 (1985)
- Wright S.D., Levine R.P.: How complement kills E.coli. I. Location of the lethal lesion.
J. Immunol. 127, 1146-1151 (1981)
- Wyle F.A., Artenstein M.S., Brandt B.L., Tramont E.C., Kasper D.L., Altieri P.L., Berman S.L., Lowenthal J.P.: Immunologic response of man to group B meningococcal polysaccharide vaccines.
J. Infect. Dis 126, 514-522 (1972)
- Ziccardi R.J., Cooper N.R.: Physiochemical and functional characterization of the C1r subunit of the first complement component.
J. Immunol. 116, 496-503 (1976)a

- Ziccardi R.J., Cooper N.R.: Activation of C1r by
proteolytic cleavage.
J. Immunol. 116, 504-509 (1976)b
- Ziccardi R.J., Cooper N.R.: The subunit composition and
sedimentation properties of human C1.
J. Immunol. 118, 2047-2052 (1977)

Lebenslauf

Name: Britta Kubens

geboren am 25. Oktober 1952 in Bochum

Eltern: Heinz und Hildegard Kubens geb.Schneider

1959-1969 Schulbildung mit Abschluß "Mittlere Reife"

1969-1974 Lehre und Tätigkeit als Bankkaufmann

1974-1976 Erlangung der Hochschulreife am Ruhr-Kolleg in Essen

1976-1982 Studium an der Ruhr-Universität Bochum
davon das Wintersemester 1979/1980 an der
University of Sussex, Brighton, England

Diplom-Hauptprüfung in Biologie

Thema der Diplomarbeit:
Geschlechtschromosomale und autosomale
DNA-Sequenzen bei *Ephestia kuehniella* Z.

Seit 1.1.83 Dissertation an der Ruhr-Universität Bochum
Institut für Hygiene und Mikrobiologie
Abt. Med. Mikrobiologie und Immunologie

Thema der Dissertation:
Untersuchungen von Serumresistenz-Mechanismen an *Escherichia coli*

Antrag auf Zulassung zur Promotion:

Januar 1987

